

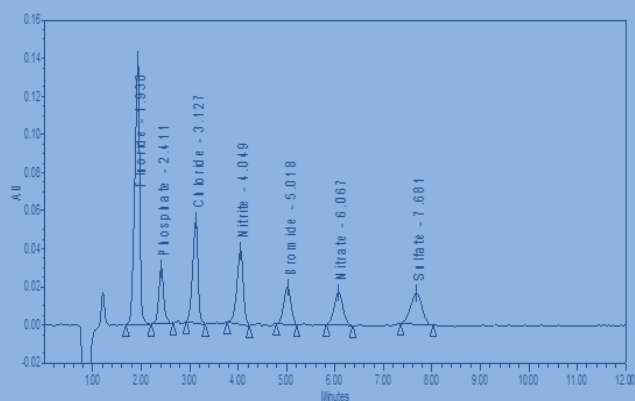


UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH



Escola d'Enginyeria d'Igualada

DETERMINACIÓ D'ANIONS D'INTERÈS EN ADOBERIA MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA IÒNICA



Autora: Carme Pérez Quiñones
Director de tesi: Joaquim Font Vallès
Programa doctorat: Enginyeria de
Projectes i Sistemes
Data: Abril 2017



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola d'Enginyeria d'Igualada



TESI DOCTORAL

Determinació d'anions d'interès en adoberia mitjançant cromatografia iònica

MEMÒRIA I ANNEXOS

Autora: Carme Pérez Quiñones

Director de tesi: Joaquim Font Vallès

Programa doctorat: Enginyeria de Projectes i Sistemes

Data: Abril 2017

Agraïments

Quan comences un doctorat ja saps que hauràs de dedicar-hi moltes hores, que no és el mateix fer-ho de joveneta que quan tens fills, que si ja és difícil conciliar la vida laboral amb la familiar, ara s'afegeix un treball de recerca. Però tot i així, amb molta il·lusió, t'atreveixes a iniciar l'aventura, perquè la ciència t'apassiona, perquè sempre has pensat que voldries continuar estudiant tota la vida, perquè creus que és el moment. Ara els nens ja són adolescents. Ha estat una aventura que he gaudit, amb molts aprenentatges, amb moltes satisfaccions, amb moltes persones al meu costat. És el moment.

Vull expressar el meu agraïment al Dr. Joaquim Font, tutor de la tesi, per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquest projecte, per orientar-me sempre tan sàviament, pels seus consells, per les seves correccions, per la seva disponibilitat, per la seva manera de treballar i motivació, que han estat fonamentals per a la meva formació.... No acabaria la llista! Gràcies per tot, Quim.

Agraïments al Dr. Agustí Marsal i al Dr. Albert Manich per la seva valuosa participació en els estudis interlaboratoris i a la Francina Izquierdo, de Pulcra Chemicals, pel subministrament de moltes de les pells analitzades en aquesta tesi.

A la Reyes, a la Mireia, a l'Anna Solà, al Roger, a la Josefina, a la Niria i a la Irene per la seva col·laboració en l'estudi de les aplicacions en algunes mostres.

Gràcies Reyes per la teva ajuda, pels cafès compartits i pels ànims que sempre m'has donat. Ara és el moment.

Agrair a INDUSTRIA DE DISEÑO TEXTIL S.A. el suport financer rebut.

Gràcies al Paco i a la Patri, els meus germans, que m'han recolzat i entès.

Gràcies al Jordi per la comprensió durant aquests anys, per ser-hi de forma incondicional.

Gràcies a la Laura i al Jordi, els meus fills:

Jordi, gràcies pels teus consells de redacció i per estar amb mi en les estones de desconnexió en què hem parlat de tantes coses, m'ha anat molt bé. Encara que tu pensessis que eres la meva "antítesis" perquè m'estaves robant temps, no ha estat mai així. Sempre has sigut font d'inspiració. Gràcies Laura per tota la positivitat i energia que em transmetes, ha estat un punt clau per poder dur a terme aquest treball.

I una especial dedicatòria als meus pares i a la meva àvia, que tot i que fa anys que no estan aquí, sempre els he considerat els impulsors de somnis que m'han motivat a intentar superar-me dia a dia. És el moment.

Gràcies, gràcies i mil gràcies a tots!

Resum

Els laboratoris del sector adober tenen la necessitat de determinar espècies aniòniques en diferents mostres. Tot i que la cromatografia iònica és actualment la millor tècnica per a aquesta anàlisi, en el sector de la pell no existien fins ara procediments basats en ella. Aquesta tesi es basa en el desenvolupament de mètodes cromatogràfics innovadors, amb una fase estacionària d'intercanvi iònic i un detector PDA, per determinar anions d'interès en la indústria de la pell. L'estudi consta de dos blocs. El primer es centra en la determinació dels anions que contribueixen a la salinitat i el segon bloc correspon a la quantificació de traces de crom hexavalent en pell i en els béns de consum de cuir. (El crom VI es determina com a anió cromat).

L'anàlisi dels anions responsables de la salinitat (clorur, nitrat, sulfat, fosfat, formiat, acetat...) inclou dues línies d'investigació, segons el sistema de detecció, UV directa o UV indirecta. La detecció directa no permet l'anàlisi d'analits no absorbents, com és el cas del clorur i el sulfat, i és per aquest motiu que també s'utilitza la detecció indirecta (adequada a tots els anions). Les fases mòbils emprades són biftalat potàssic (detecció indirecta) i sulfat sòdic (detecció directa). Els mètodes s'apliquen amb èxit a diverses mostres: pells, aigües i productes químics.

Fins ara, la determinació de traces de crom hexavalent en pells es duia a terme mitjançant la Norma ISO 17075:2007, basada en el mètode clàssic fotolorimètric de la difenilcarbàzida, i que presenta una sèrie de limitacions. En la segona part de la tesi es desenvolupa i valida un mètode HPLC que permet l'anàlisi directa del Cr (VI) en l'extracte, sense filtració per cartutx SPE. L'extracció del crom es realitza amb un tampó fosfat a pH 7,5-8,0, d'acord amb el mètode colorimètric. L'eluent és un electròlit de sulfat amònic a pH 8,0. L'estudi comparatiu entre la norma ISO 17075:2007 i el nou mètode conclou que l'HPLC és una millor alternativa per a la determinació de crom (VI). El mètode cromatogràfic escurça el procediment de la norma colorimètrica, disminueix la càrrega de treball, redueix la quantitat de residus de laboratori i proporciona resultats més precisos. La cromatografia iònica és capaç de mesurar la concentració de crom (VI) de mostres de fins a 3 mg/kg (límit de quantificació establert per la Comissió Europea). Aquest nou procediment s'ha publicat com a norma ISO 17075-2:2017 el febrer d'aquest mateix any.

Paraules Clau: *anions, pell, detecció indirecta, detector fotodíodes, cromatografia iònica, HPLC, crom hexavalent, ISO 17075, productes químics per adoberia*

Abstract

The laboratories of the leather sector have the necessity to analyse anionic species in different samples. Although ionic chromatography is currently the best method for this analysis, until now, the processes based on it were non-existent. The purpose of this thesis is the development of innovative chromatographic methods, with an ion-exchange stationary phase and a PDA detector, to determine anions of interest in the leather industry. This study contains two blocks. The first one focuses on the determination of the anions that contribute to salinity and the second block corresponds to the quantification of traces of hexavalent chromium in leather and in leather consumer goods. (Chromium VI is determinate as chromate anion).

The analyses of the responsible anions of salinity (chloride, nitrate, sulphate, phosphate, formate, acetate...) include two investigation lines, according to the detection system, direct or indirect UV. The direct detection does not allow the analysis of non-absorbent analytes, such as chloride and sulphate, and for that reason it is also used the indirect detection (appropriate to all anions). The mobile phases used are potassium biftalate (indirect detection) and sodium sulphate (direct detection). The methods are successfully applied to different samples: leathers, waters and chemical products.

Up to now, the determination of traces of hexavalent chromium in leather was carried out under the ISO 17075:2007 standard, based on the classical method of the diphenylcarbazide, which has some limitations. In the second part of this thesis, an HPLC method, which allows the direct analysis of chromium (VI) of the sample without any clean up process, is developed and validated. Samples are extracted at pH 7.5-8 with a phosphate buffer, according to the method of the ISO 17075 standard. An ammonium sulphate electrolyte at pH 8 is used as mobile phase. The comparative study between the ISO 17075:2007 and the new method concludes that the HPLC method is a better alternative for determining chromium (VI). The chromatographic method shortens the procedure of the colorimetric standard, decreases the amount of work, reduces the quantity of laboratory wastes and provides more accurate results. The ionic chromatography is able to measure the chromium (VI) concentration of samples up to 3mg/kg (the limit of quantification established by the European Commission). This research has eventually led to the publication of the new standard chromatographic ISO 17075-2:2017.

Keywords: *anions, leather, indirect detection, diode array detector, ionic chromatography, HPLC, hexavalent chromium, ISO 17075, chemical products*

Índex

Agraïments

Resum

Abstract

Índex

FONAMENTS

Capítol 1. Introducció.....1

1.1. Justificació..... 1

1.2. Objectius 5

1.3. Estructura de la memòria 8

Capítol 2. Els anions en la indústria de la pell:interès, origen i reducció, anàlisi.....11

2.1. Introducció: els anions en les adoberies..... 11

2.2. Components aniònics en matèries primeres bàsiques d'adoberia..... 12

2.3. Components aniònics en el cuir 18

2.4. La salinitat en les aigües residuals d'adoberia..... 22

2.5. El crom hexavalent en la pell 27

2.6. Visió de les metodologies d'anàlisi d'anions 34

Capítol 3. La cromatografia iònica.....37

3.1. Introducció 37

3.2. Columnes cromatogràfiques en Cl..... 39

3.3. Principals detectors en CI : conductimètric i UV	42
3.4. La detecció ultraviolada indirecta	44
3.5. Principals factors que afecten la separació en CI	44
3.6. Passos en una separació per CI	46
3.7. Antecedents en la determinació d'anions per CI i detecció UV.....	47
3.7.1. Antecedents en la determinació simultània d'anions per cromatografia iònica i detecció UV directa.....	48
3.7.2. Antecedents en la determinació simultània d'anions per cromatografia iònica i detecció UV indirecta	49
3.7.3. Antecedents en la determinació de crom hexavalent per CI i detecció UV directa	52
Capítol 4. Validació de mètodes analítics.....	55
4.1. Concepte de validació	55
4.2. Estratègies de validació de mètodes	56
4.2.1. Estudi intralaboratori (validació interna)	56
4.2.2. Estudi en col·laboració amb altres laboratoris (validació externa)	57
4.3. Paràmetres de validació de mètodes.....	60
4.3.1. Selectivitat.....	61
4.3.2. Linealitat i Rang.....	62
4.3.3. Límit de detecció i límit de quantificació	62
4.3.4. Precisió.....	65
4.3.5. Exactitud.....	65

BLOC EXPERIMENTAL 1

Capítol 5. Desenvolupament de metodologia per a la determinació simultània d'anions

absorbents i no absorbents (CI)	67
5.1. Introducció	67
5.2. Instrumental, material i reactius.....	70
5.3. Registre d'espectres dels anions a assajar	72
5.4. Estudi amb detecció UV indirecta	74
5.4.1 Objectius	74
5.4.2. Definició de les condicions cromatogràfiques inicials	74
5.4.3. Resum de les condicions cromatogràfiques inicials seleccionades	80
5.4.4. Proves analítiques preliminars	80
5.4.5. Conclusions de les proves preliminars	85
5.4.6. Estudi de la influència dels factors que afecten la separació cromatogràfica	85
5.4.7. Condicions cromatogràfiques proposades	98
5.4.8. Temps de retenció dels anions inorgànics (detecció indirecta).....	98
5.4.9. Viabilitat de la determinació d'anions orgànics amb detecció UV	99
5.4.10. Linealitat dels calibratges.....	101
5.4.11. Conclusions de l'estudi amb detecció indirecta.....	102
5.5. Metodologia amb CI i detecció UV directa	104
5.5.1. Introducció i objectius.....	104
5.5.2. Selecció de les fases mòbils	105
5.5.3. Avaluació de la fase mòbil borat-gluconat.....	105

5.5.4. Linealitat de les rectes de calibratge per a la quantificació de nitrat i nitrit amb l'eluent borat-gluconat	107
5.5.5. Avaluació d'una nova fase mòbil, el sulfat sòdic	108
5.5.6. Linealitats de les rectes de calibratge amb la fase mòbil sulfat sòdic	110
5.5.7. Comparació de les linealitats obtingudes amb els dos eluents assajats (borat-gluconat i sulfat sòdic)	111
5.5.8. Robustesa del nou mètode amb sulfat sòdic enfront al pH de la fase mòbil	112
5.5.9. Conclusions de l'estudi amb detecció directa.....	114
5.6. Conclusions generals.....	115
Capítol 6. Aplicació de la cromatografia iònica a la determinació d'anions en pells.....	117
6.1. Introducció	117
6.2. Objectius	118
6.3. Materials i reactius.....	119
6.4. Mostres de pells.....	119
6.5. Procediment.....	120
6.5.1. Preparació de la mostra	120
6.5.2. Extracció de matèries solubles de la pell.....	121
6.5.3. Determinació dels anions.....	123
6.6. Estudi de l'eficàcia de l'extracció dels anions segons norma UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6)	130
6.6.1. Influència de la velocitat en l'eficàcia de l'extracció.....	132
6.6.1.1. Resultats i conclusions	133
6.6.2. Influència del tipus d'extracció (simple i múltiple) en l'eficàcia de l'extracció	139

6.6.2.1. Resultats i conclusions	142
6.7. Exploració de la validació del mètode	147
6.7.1. Selectivitat.....	147
6.7.2. Linealitat i rang.....	148
6.7.3. Límit de detecció	148
6.7.4. Precisió	149
6.7.5. Exactitud.....	151
6.7.6. Conclusions de l'estudi exploratori sobre la validació	152
6.8. Conclusions generals.....	153
Capítol 7. Exploració d'altres aplicacions de la metodologia per Cl: productes químics del sector adober, mostres mediambientals i d'altres sectors	157
7.1. Introducció i objectiu	157
7.2. Determinació de clorurs i sulfats en colorants, dispersants naftalensulfònics, extractes de mimosa, olis i àcid fòrmic (detecció indirecta)	158
7.2.1. Mostres	158
7.2.2. Mètodes	158
7.2.3. Resultats i conclusions	162
7.3. Quantificació d'àcids fòrmics comercials (detecció directa)	164
7.3.1. Mostres	164
7.3.2. Mètode.....	164
7.3.3. Resultats i conclusions	165
7.4. Aplicació del nou mètode amb detecció directa a la determinació de nitrats en aigües d'interès ambiental.....	166
7.4.1. Mostreig	167
7.4.2. Mètode (detecció directa)	167

7.4.3. Resultats i conclusions	168
7.5. Estudis d'intercomparació d'anàlisi d'aigües residuals (HPLC detecció indirecta) ..	169
7.6. Aplicacions a altres sectors	170
7.6.1. Nitrats en fertilitzants (amb fase mòbil sulfat sòdic, detecció directa) ...	170
7.6.2. Sulfats i fosfats en banys galvànics (detecció indirecta)	170
7.6.3. Aplicació qualitativa del mètode en estudis de paleontologia	171
7.7. Conclusions generals.....	171

BLOC EXPERIMENTAL 2

Capítol 8. Determinació de crom hexavalent en pell per CI

8.1. Justificació i planificació de la investigació	173
8.2. Evolució i problemàtica del mètode analític per a la determinació del crom hexavalent en pell	175
8.3. Objectius	181
8.4. Instrumental, materials i reactius	183
8.5. Selecció dels paràmetres experimentals cromatogràfics	185
8.5.1. Fase mòbil	185
8.5.2. Condicions de detecció: longitud d'ona i interval de registre de l'espectre	190
8.5.3. Volum d'injecció.....	193
8.5.4. Consideracions pràctiques: seqüència d'anàlisi, rutina de treball, precaucions i manteniment	195
8.5.5. Resum de les condicions cromatogràfiques	196
8.6. Identificació del crom (VI) en el cromatograma	197

8.7. Calibratge	198
8.7.1. Linealitat.....	198
8.7.2. Estabilitat i robustesa del calibratge.....	199
8.8. Esquema del nou procediment cromatogràfic	201
8.9. Validació interna del mètode cromatogràfic	202
8.9.1. Selectivitat.....	202
8.9.2. Linealitat i Rang.....	203
8.9.3. Límit de detecció i límit de quantificació	203
8.9.4. Precisió: Comparativa entre els mètodes colorimètric i HPLC.....	205
8.9.5. Exactitud: Comparativa entre els mètodes colorimètric i HPLC	207
8.10. Assajos col·laboratius interlaboratoris (validació externa).....	210
8.11. Conclusions generals de la validació del mètode cromatogràfic.....	211
8.12. Comparativa entre el mètode colorimètric i el nou mètode cromatogràfic	213
8.12.1. Càrrega de treball i consumibles.....	213
8.12.2. Casos conflictius resolts	217
8.13. Conclusions generals.....	218

CONCLUSIONS FINALS

Capítol 9. Conclusions finals, recomanacions i difusió dels resultats	221
9.1. Conclusions finals i recomanacions	221
9.2. Difusió dels resultats.....	231

BIBLIOGRAFIA, ÍNDEXS TAULES I FIGURES, GLOSSARI

<i>Referències bibliogràfiques</i>	233
<i>Índex de taules</i>	247
<i>Índex de figures</i>	251
<i>Glossari/Abreviatures.....</i>	255

ANNEXOS

<i>Annex 1. Espectres UV d'anions d'interès</i>	257
<i>Annex 2. Resultats de l'estudi de robustesa (sulfat sòdic com a eluent)</i>	263
<i>Annex 3. PNT Determinació de fosfat per fotolorimetria.....</i>	271
<i>Annex 4. Cromatograma d'una pell de mamut.....</i>	281
<i>Annex 5. Manteniment, regeneració i conservació de la columna cromatogràfica</i>	285
<i>Annex 6. PNT Determinació de Cr (VI) per Cl en mostres de pell.....</i>	291
<i>Annex 7. Resultats dels Interlaboratoris del Cr(VI)</i>	309
<i>Annex 8. Difusió dels resultats</i>	315

Capítol 1. Introducció

1.1. Justificació

El control de qualitat en la fabricació de curtits necessita de mètodes analítics adequats per examinar les matèries primeres, verificar els processos de producció, vigilar les emissions i els seus tractaments, i en definitiva, per assegurar la qualitat del producte final (1).

La indústria de la pell utilitza gran varietat de productes químics en les diferents etapes del procés d'adobament. Una part d'aquests productes són absorbits per les pells, mentre que la resta passen a les aigües residuals. Molts d'aquests productes químics presenten un component aniònic, com per exemple sulfat, clorur, format...

Un contingut elevat d'anions solubles en diferents mostres d'adoberia no és convenient perquè pot provocar efectes negatius, com ara taques en la superfície del cuir, corrosió dels objectes metàl·lics en contacte amb el cuir, disminució de propietats físiques del producte final i elevada salinitat en els abocaments de fàbrica. Cal considerar també les impureses aniòniques presents en alguns productes químics comercials, ja que contribueixen en gran mesura a l'augment de salinitat. Un dels principals problemes mediambientals en la indústria de la pell és l'elevada salinitat en els abocaments de fàbrica.

Així doncs, els laboratoris del sector adober tenen la necessitat d'analitzar espècies aniòniques en diferents mostres: aigües residuals, banys de diferents etapes, pells adobades i productes químics. La cromatografia iònica és actualment la millor tècnica per a l'anàlisi d'anions, i en el sector adober no existeixen procediments per determinar anions amb aquesta tècnica.

Aquesta tesi es realitza dins la línia de **desenvolupament de procediments analítics innovadors d'aplicació a la indústria del cuir**. Es centra en la **cromatogràfica iònica (CI)** amb detecció ultraviolada directa i indirecta per determinar els principals anions d'interès en adoberia en diverses mostres (aigües residuals, productes químics, pells acabades, objectes manufacturats amb pell...)

En la **part experimental** d'aquest estudi es poden diferenciar **dos blocs**:

1. Desenvolupament i aplicació de metodologia cromatogràfica per a la determinació dels anions que contribueixen a la salinitat en la indústria de la pell.
2. Desenvolupament i validació d'un mètode cromatogràfic per quantificar el crom hexavalent en pells (en forma d'anió cromat).

El **primer bloc** de la tesi correspon a l'anàlisi d'anions que contribueixen a la salinitat (clorur, nitrat, sulfat, fosfat, formiat, acetat...) i inclou dues línies d'investigació, segons el sistema de detecció (UV directa i UV indirecta).

Aquests anions d'interès en adoberia s'han analitzat fins ara per mètodes analítics clàssics o per mètodes instrumentals, diferents als cromatogràfics, que determinen ions individuals (metòdiques colorimètriques, potenciomètriques, valoracions redox...). Els mètodes tradicionals impliquen lentitud, menys precisió, menys exactitud, major consum de reactius, més interferències de matriu i generen més residus de laboratori.

La tendència actual en l'anàlisi d'anions és l'ús de tècniques sensibles i ràpides, com la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Actualment, la cromatografia iònica, un tipus d'HPLC, és la millor tècnica per a l'anàlisi d'ions perquè permet detectar i quantificar simultàniament ions de forma fiable, ràpida i reproducible (2-6). La CI permet utilitzar un cromatògraf de líquids convencional, simplement cal utilitzar una columna cromatogràfica específica per determinar anions.

Altres sectors que empren la cromatografia líquida iònica es basen en cromatògrafs amb detector conductimètric, que permet la detecció de tots els anions.

La majoria de laboratoris del sector pell també disposen de cromatògraf de líquids, encara que amb detector ultraviolat (UV), per la seva alta versatilitat. Forma part de l'equipament estàndard d'obligada adquisició en un laboratori d'anàlisi del sector de la pell. Algunes de les seves aplicacions amb metodologia oficial ISO vigent són l'anàlisi de formaldehid i de fungicides, com el TCMTB (7-9). Però aquests laboratoris del sector adober no utilitzen la cromatografia per a l'anàlisi d'ions perquè el detector UV no permet la detecció directa d'anions no absorbents, com ara clorurs o sulfats. Caldria inversió econòmica en l'adquisició del detector conductimètric per a la determinació dels anions no cromòfors.

Aquesta tesi pretén contribuir a l'anàlisi simultània d'anions absorbents i no absorbents en el sector adober per cromatografia iònica emprant un detector no habitual per ions no cromòfors, el detector UV. S'han dut a terme dues línies de recerca diferenciades en el sistema de detecció, la detecció UV indirecta i la detecció UV directa. La indirecta està indicada per a ions que no absorbeixen en el rang UV-VIS (clorur, sulfat, fosfat, fluorur), encara que també permet l'anàlisi d'anions absorbents. La cromatografia iònica amb detecció UV directa permet determinar anions absorbents (com ara nitrat, nitrit i bromur) i poc absorbents (formiat). La metodologia desenvolupada s'aplicarà a la determinació d'anions en pells, productes químics, mostres d'interès ambiental...

Un altre dels anions que es podria trobar en les pells, el **cromat**, presenta una problemàtica tan important que el desenvolupament de metodologia per a la determinació de crom hexavalent ha estat un tema d'estudi en aquesta tesi, configurant el **segon bloc de la part experimental de la memòria**. La norma EN ISO 17075:2007 (10), únic mètode oficial per a la determinació de Cr(VI) fins el 2017, es basa en la fotocolorimetria i presenta una sèrie de limitacions. Les noves restriccions imposades per la UE al Cr(VI) (11) han motivat la recerca d'un procediment cromatogràfic, més fiable que el colorimètric i que pugui esdevenir futura norma ISO.

La presència de crom hexavalent en la pell és de gran interès en el sector adober, degut a la seva toxicitat. Qualsevol notícia relacionada amb l'aparició en el mercat d'articles amb un elevat contingut en Cr(VI) genera alarma en el sector i impacte social.

En l'actualitat, aproximadament el 90% de la producció mundial del cuir es curteix amb Cr(III) (12,13). El crom trivalent no és tòxic. Tot i que la transformació de Cr(III) a Cr(VI) requereix condicions extremes, i es coneixen les recomanacions per prevenir la formació de crom (VI) en les pells, existeix un risc potencial de generació de crom hexavalent.

Com s'ha indicat anteriorment, la UE ha imposat, des de maig del 2015, noves restriccions al Cr(VI) (11). D'acord amb aquesta normativa, els articles de cuir o els que contenen peces de cuir que entren en contacte amb la pell de l'usuari, no han de comercialitzar-se quan tinguin un contingut de crom (VI) igual o superior a 3 mg/kg del pes sec total del cuir o la part de cuir. Qualsevol article de cuir (sabata, bossa, cinturó...) que superi aquest límit, haurà de ser retirat del mercat. L'any 2015 les autoritats sanitàries espanyoles van retirar del mercat i van prohibir la importació de més de 53 models de calçat de 19 marques que presentaven elevats continguts de crom hexavalent (14,15)

La restricció proposada es centra en el risc d'inducció de sensibilització de la pell relacionat amb un contacte directe o indirecte amb articles de cuir o articles amb parts de cuir que contenen crom (VI). Aquesta estricta regulació es justifica per l'aparició de diversos casos de dermatitis al·lèrgiques vinculades al contacte de cuirs amb crom.

El mètode d'anàlisi és doncs, de vital importància per quantificar de forma fiable el contingut de Cr(VI) en pell. La norma EN ISO 17075:2007 per a la determinació de crom hexavalent en cuirs basada en la colorimetria, única vigent quan es va començar la tesi, presenta una sèrie d'inconvenients com ara lentitud, elevada incertesa i possibles falsos positius. A causa d'aquestes limitacions, els centres d'investigació i comitès d'anàlisi han dedicat esforços a la recerca d'un nou mètode alternatiu. S'han proposat diverses tècniques d'anàlisi: espectrometria d'absorció atòmica (16), electroforesi capil·lar (17), voltamperometria (18,19) i espectrofotometria d'injecció de flux (20,21). Aquestes metodologies no s'han adoptat com a mètodes oficials pels comitès internacionals per varies raons: manca de fiabilitat, lentitud, elevada incertesa en equipaments i alta incertesa, entre d'altres. L'interès en trobar un nou mètode alternatiu ha crescut amb la nova restricció imposada al Cr(VI).

Atès que el crom hexavalent s'extreu de les pells i es determina com a anió cromat, en aquest treball es desenvolupa un nou mètode basat en la cromatografia iònica que permet la seva quantificació d'una forma més fiable que l'actual mètode oficial. L'estudi ha participat activament en el Comitè Tècnic que redacta les propostes de nous mètodes ISO. Concretament ha participat en el grup de treball WG1 creat pel Comitè Tècnic CEN-TC289 en col·laboració amb IULTCS, ISO i CEN amb la finalitat de que el mètode cromatogràfic pogués ser aprovat com a Norma oficial EN-ISO.

En definitiva, amb aquesta tesi es pretén obrir un camí, encara no explorat, cap a l'aplicació de la cromatografia iònica a la determinació d'anions en el sector adober per tal d'aprofitar els avantatges que proporciona la tècnica cromatogràfica. S'optimitzaran al màxim els recursos d'un laboratori del sector pell, que ja disposen d'un sistema d'HPLC amb detecció UV en les seves instal·lacions, i l'únic subministrament addicional és una columna d'intercanvi iònic. (Amb la mateixa columna es duran a terme totes les determinacions). Tampoc caldrà fer una inversió en un detector conductimètric perquè s'opta per la detecció UV indirecta per quantificar els anions no absorbents.

1.2. Objectius

En base als arguments exposats en l'apartat anterior, i tenint en compte la necessitat de crear mètodes ràpids i fiables per a l'anàlisi d'anions en el sector adober, els **objectius generals** del present treball de doctorat són:

- Desenvolupar mètodes cromatogràfics innovadors, amb detecció UV indirecta i directa, per a la determinació simultània dels principals anions d'interès que contribueixen a la salinitat com ara clorurs, sulfats, nitrats, fosfats, formiats i ions similars (nitrats, nitrits, bromurs, fluorurs).
- Aplicar els mètodes desenvolupats a l'anàlisi simultània d'anions en mostres de diferent procedència (pells, aigües residuals i productes químics).
- Desenvolupar i validar un nou mètode, basat en la cromatografia d'intercanvi iònic, per dur a terme la determinació de crom (VI) en cuirs. El mètode desenvolupat ha de permetre resoldre els inconvenients del mètode fotolorimètric EN ISO 17075:2007 i ha de complir amb el límit de quantificació establert per la comissió europea perquè pugui convertir-se en futura norma.

Per aconseguir aquests objectius generals, caldrà assolir una sèrie d'**objectius específics**:

- Realitzar una recerca bibliogràfica per conèixer els antecedents en l'àmbit d'anàlisi d'anions per cromatografia iònica que permeti determinar les aportacions més significatives dels diferents autors i així establir unes condicions cromatogràfiques de treball inicials en cada un dels mètodes a desenvolupar

Objectius específics en la determinació simultània d'anions absorbents i no absorbents

a) Estudi amb detecció UV indirecta

- Demostrar la viabilitat de la cromatografia iònica amb detecció UV indirecta per a la determinació d'anions, absorbents i no absorbents.
- Estudiar l'efecte dels diferents paràmetres sobre el resultat cromatogràfic.
- Seleccionar les condicions cromatogràfiques que permetin la separació d'anions inorgànics amb una única injecció.
- Desenvolupar un mètode cromatogràfic per detectar i quantificar simultàniament els anions d'interès en adoberia (absorbents i no absorbents en l'ultraviolat).
- Aplicar el mètode desenvolupat a mostres reals

b) Estudi amb detecció UV directa:

- Avaluar el comportament de la fase mòbil borat-gluconat, la més recomanada a la literatura per a anions orgànics i inorgànics absorbents, en la determinació dels anions d'interès en adoberia.
- Estudiar alguna altra fase mòbil per comparar-la amb la de borat-gluconat i comprovar quina d'elles proporciona millors resultats.
- Desenvolupar un mètode cromatogràfic que permeti detectar i quantificar anions orgànics i inorgànics d'interès amb una única injecció i en un temps d'anàlisi adequat.
- Aplicar el mètode desenvolupat a diferents tipus de mostres del sector adober.

Objectius específics en la determinació de crom hexavalent en pells

- Seleccionar les condicions experimentals del nou mètode cromatogràfic.
- Elaborar les rutines del treball cromatogràfic (temps d'equilibrat, precaucions i manteniment del sistema cromatogràfic).
- Redactar el PNT per a la determinació de Cr(VI) per Cl.
- Aplicar el nou mètode cromatogràfic a tot tipus de matrius de cuir i complements de forma comparativa amb la norma ISO 17075:2007 (mètode de la difenilcarbazida) per obtenir dades de d'exactitud, precisió i capacitat productiva.
- Validar el nou mètode HPLC amb la participació en assajos interlaboratoris nacionals i internacionals.
- Participar en el Comitè Tècnic que redacta les propostes dels nous mètodes ISO (CEN/ISO TC 289).

1.3. Estructura de la memòria

La present memòria s'estructura en 9 capítols. Els quatre primers contenen la revisió bibliogràfica i els fonaments teòrics bàsics que han estat necessaris per dur a terme la part experimental. En els altres capítols es concentra el desenvolupament experimental.

En aquest primer capítol es justifica la necessitat de desenvolupar i implementar metodologia cromatogràfica per determinar anions en el sector adober. També es detallen els objectius de la tesi.

El Capítol 2 ofereix una visió de l'origen i de la importància dels principals components aniònics del sector adober. Així mateix, presenta la situació actual de les metodologies d'anàlisi d'anions en diferents mostres del sector.

El Capítol 3 es centra en la metodologia analítica emprada en la tesi, la cromatografia iònica. S'introdueixen els fonaments de la tècnica i es recullen els antecedents bibliogràfics relacionals amb la determinació dels anions d'interès per CI amb detecció UV. Aquestes referències seran de gran utilitat en la part experimental per seleccionar les condicions cromatogràfiques inicials de partida.

El Capítol 4 defineix els conceptes bàsics de validació de mètodes analítics.

El **primer bloc** experimental de la tesi, la determinació dels anions inorgànics i orgànics d'interès, es tracta en els Capítols 5, 6 i 7.

En el Capítol 5 es presenten les proves realitzades per desenvolupar els procediments que permeten determinar simultàniament anions absorbents i no absorbents en l'UV. Es duen a terme dues línies d'investigació: la detecció UV directa i la indirecta.

En els Capítols 6 i 7 s'apliquen els mètodes desenvolupats a diferents mostres del sector adober. La metodologia es valida per a la determinació d'anions en pells i s'analitza el contingut aniònic de dotze mostres de cuir. A més, es determinen impureses aniòniques en colorants, extractes tànnics, olis i dispersants naftalensulfònics; es quantifiquen àcids fòrmics comercials; i s'analitzen nitrats en

mostres d'aigües. Finalment, s'exposen els resultats de la participació en assajos interlaboratoris per determinar nitrats, clorurs i sulfats en aigües residuals mitjançant la metodologia desenvolupada amb detecció indirecta i es proposen aplicacions a altres sectors.

El Capítol 8 correspon al **segon bloc** de recerca, i en ell es desenvolupa i valida un mètode cromatogràfic per a la determinació de crom hexavalent en pell. Es mostren els resultats de la validació interna i de la validació mitjançant assajos interlaboratoris. D'altra banda, també es duu a terme una comparativa entre el mètode colorimètric i el nou mètode cromatogràfic.

Per acabar, el Capítol 9 resumeix les conclusions principals i les recomanacions, i cita les publicacions, ponències i documents normatius que ha generat la tesi i que han permès la difusió dels resultats.

Capítol 2. Els anions en la indústria de la pell: interès, origen i reducció, anàlisi

2.1. Introducció: els anions en les adoberies

L'adobament de les pells és una tècnica mil·lenària; des de la prehistòria l'home ha utilitzat les pells animals per protegir-se del fred. El procés d'adobament té com a objectiu final la transformació de la pell en brut de determinats animals (altament putrescible) en un material estable adequat per al seu posterior ús industrial. Actualment, la indústria de la pell nodreix a sectors com el del calçat, la confecció, la decoració d'interiors i mobiliaris o la indústria automobilística.

En el procés d'adobament de les pells s'utilitzen diversitat de productes químics. Una part dels productes emprats en les diferents etapes de la indústria adobera són absorbits per les pells, mentre que la resta passen a les aigües residuals produint un increment de la salinitat dels efluent d'adoberia. Molts d'aquests productes presenten un component aniònic (clorur, sulfat, formiat, nitrat...). L'excés de salinitat en els efluent d'adoberia i en la pell suposen una problemàtica, tal com es detallarà en els apartats següents.

Un altre anió d'especial interès en el sector adober és el cromat. L'adobament amb sals de crom trivalent, àmpliament utilitzat per les bones característiques que aporta al cuir, sempre ha creat polèmica degut a la possibilitat de generació de crom hexavalent a partir del crom trivalent. El Cr(VI) és altament tòxic, no és estable com a catió, sinó que es troba en forma d'anions tals com el cromat. I és precisament en forma de cromat com s'extreu de la pell per a la seva posterior quantificació.

Els anions són doncs, espècies químiques que s'han d'analitzar en diverses mostres del sector adober com per exemple productes comercials, pells adobades, aigües residuals i banys de diferents etapes. Cal determinar anions perquè la normativa mediambiental

regula contingut aniònic. A més, l' anàlisi de cations es realitza de manera eficaç per emissió atòmica.

En aquest sentit, el control de qualitat del sector adober precisa disposar de mètodes d'anàlisi adequats per examinar les matèries primeres, verificar els processos de producció, vigilar les emissions i els seus tractaments, i en definitiva, per assegurar la qualitat del producte final i complir els requisits normatius (1).

Aquest capítol ofereix una visió de l'origen, la importància, la problemàtica i reducció dels principals components aniònics presents en el sector adober. També presenta un resum de la situació actual de les principals metodologies relacionades amb l'anàlisi d'anions en diverses mostres del sector (matèries primeres bàsiques, cuir, banys de diferents etapes dels processos d'adoberia i aigües residuals).

2.2. Components aniònics en matèries primeres bàsiques d'adoberia

El procés d'adobament de la pell per obtenir un producte final estable i apte pel consum industrial consta de diferents etapes amb diferents objectius i requeriments de reactius. Aquests productes químics contenen anions, una part dels quals són absorbits pel cuir i una altra part passen als efluents. La Taula 1 resumeix les diverses etapes del procés d'adobament, els principals productes químics emprats i els seus components aniònics, i els efluents generats (1,13,22).

.

Etapa i objectiu	Principals matèries/productes químics	Principals anions d'interès	Efluents més significatius
Conservació: tractament amb sal o assecat per evitar la putrefacció de la pell.	Sal (clorur sòdic)	Clorur	Sal bruta
Remull: neteja i re establiment del grau d'hidratació de la pell.	Aigua, tensioactius i enzims, bactericides	Clorur	Aigua residual bruta i salada
Pellam i Calciner: eliminació del pèl fixat a la pell i afluixament del col·lagen	Aigua, sulfur o sulfhidrat sòdic, calç, enzims	Sulfur	Aigua residual alcalina i sulfurada amb càrrega orgànica elevada. Pèl brut amb càrrega de sulfur.
Descarnat: eliminació del teixit subcutani i adipós (mitjançant cilindre de ganivets)	Aigua	-Diferents anions en les carnasses -Sulfur en aigües	Carnasses i aigua alcalina.
Dividit : seccionar la pell per disminuir el seu gruix	Pell sense dividir	--	Pell dividida (flor i serratge)
Desencalcinament: eliminació de restes d'hidròxid càlcic i de sulfur de la pell	Aigua, sulfat amònic, clorur amònic, blanquejants, àcids febles (làctic, cítric, fòrmic..)	Sulfat, clorur, lactat, formiat, citrat, sulfur	Aigua residual lleugerament àcida.
Rendit: acció enzimàtica per degradar les fibres de la dermis	Enzims, sal amònica, sulfat sòdic o clorur sòdic, tensioactiu	Clorur, sulfat	Aigua residual lleugerament bàsica i neutra.
Píquel: aconseguir el pH adequat en la pell pel posterior adobament	Aigua, sal, àcids forts i/o febles	Sulfat, formiat	Aigua residual àcida i salina.
Desengreixat: eliminació de l'excés de greix natural de la pell	Tensioactius, dissolvent, sal	--	Greix. Aigua residual neutra, greixosa i salada.
Adobament al crom: estabilització de les fibres col·lagèniques front la putrefacció (gràcies a les sals de crom)	Sal de crom, formiat sòdic, sals orgàniques, bicarbonat sòdic	Formiat, sulfat,	Aigua residual amb Cr(III) (Continua)

Adobament vegetal: estabilització del col·lagen front la putrefacció (gràcies als extractes i tanins vegetals)	Extractes vegetals, tanins sintètics (sintans)	--	Aigua residual amb extractes vegetals i productes sintètics
Rebaixat: ajustar el gruix de la pell al valor desitjat	Pell sense rebaixar	Sulfat, formiat, clorur	Rebaixadures (virutes de pell)
Neutralitzat: aconseguir un pH adequat en la pell per a les operacions següents	Aigua, formiat sòdic, bicarbonat sòdic	Formiat	Aigua residual lleugerament àcida
Readobament : tractaments per aconseguir característiques específiques en les pells	Resines, rellenants, sals de crom, extractes vegetals	Formiat, sulfat	Aigües residuals amb productes readobants
Tintura: proporcionar color i solidesa desitjades a la pell	Colorant, àcid fòrmic, productes auxiliars	Formiat	Aigua residual àcida i colorejada
Greixatge: proporcionar a les pells tacte, suavitat i hidrofugació	Olis, àcid fòrmic, (eventualment sals de crom). Alguns engreixants poden contenir fosfats, polifosfats o esters d'àcids fosfòric (per disminuir la duresa)	Formiat, sulfat,	Aigua residual amb restes d'emulsionants (i eventualment amb sals de crom)
Escorregut: eliminar excés d'aigua mitjançant calor	Pell	Formiat, sulfat	Formiat, sulfat Aigua amb traces d'àcid i greix
Assecatge: eliminació de l'excés d'aigua mitjançant aire calent.	Aire calent, pell humida	Formiat	Vapor amb aigua i àcid fòrmic
Acabat: tractament final en la superfície del cuir embellir-lo i millorar les seves propietats d'ús	Resines, laques, ceres, pigments, colorants		Aigües residuals, aire amb traces de productes d'acabat, COV's

Taula 1. Principals productes emprats en les etapes d'adoberia. Anions i efluents generats.

S'observa que els anions més habituals presents en els productes comercials d'adoberia són clorur, sulfat i formiat (Taula 1).

La guia de les **Millors Tecnologies Disponibles** (MTD) en el sector adober proporciona algunes recomanacions referents als productes químics, tals com conèixer les seves propietats, substituir els perjudicials per al medi ambient per altres que ho siguin menys, mantenir un inventari d'entrades i sortides i determinar els paràmetres adequats per monitoritzar les emissions al medi ambient (13,22).

Generalment es coneix la identitat de les matèries primeres bàsiques emprades en les adoberies, i només es pretén determinar la seva concentració per comprovar la regularitat en les seves propietats. Es controla doncs, la composició. La Taula 2 mostra la relació dels **controls analítics** més rellevants emprats en adoberia per comprovar la qualitat dels **productes comercials** amb component aniònic (1). La major part dels àcids utilitzats en adoberia es determinen per la seva acidesa total mitjançant volumetria de neutralització.

Producte	Determinació	Procediment analític	Referència	Valors habituals
Àcid fòrmic	Riquesa (% d'àcid fòrmic)	Valoració de l'acidesa total amb NaOH 0,1 N	(23)	85%
		Valoració del poder reductor total amb KMnO_4 en calent en excés, seguit de iodometria.	(24)	85%
	Presència de sulfats	Neutralitzar i tractar amb clorur bàric		traces
	Presència d'altres àcids orgànics	HPLC, CG o electroforesi capil·lar	(25)	traces
Àcid acètic	Riquesa (% d'àcid)	Valoració de l'acidesa total amb Na OH 0,1 N	(23)	80-99%
Àcid làctic	% d'àcid làctic lliure	Valoració amb Na OH 0,1N i fenolftaleïna	(23)	40-60%
	Riquesa en àcid làctic total	Afegir NaOH 0,1 N en excés, escalfar al bany Maria, refredar i valorar amb àcid sulfúric 0,1 N	(23)	40-60%
Àcid oxàlic	% d'àcid oxàlic	Volumetria redox amb permanganat potàssic	(26)	99-100%
Àcid sulfúric	Riquesa (% H_2SO_4)	Valoració de l'acidesa total amb NaOH 0,1 N	(23)	96-98%
Sal comú	Riquesa en clorur sòdic (% NaCl)	Titulació amb nitrat de plata 0,1 N	(27)	96-100%

Taula 2. Relació de controls analítics en productes d'adoberia que presenten algun component aniònic (1)

També és important considerar el **control de les impureses**. Durant la síntesi de qualsevol producte químic s'obté el producte desitjat i paral·lelament una sèrie de subproductes o impureses. Per exemple, és ben conegut que els **colorants** concentrats comercials es precipiten durant la seva síntesi per l'addició de sal.

La Fig. 1 mostra el procés general de producció de colorants azoics.

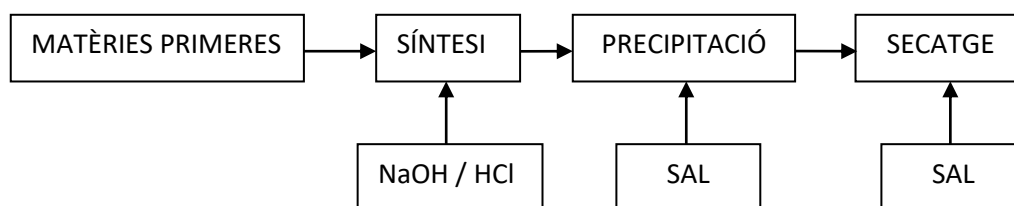


Fig. 1. Esquema del procés de producció de colorants azoics (28)

Però aquesta no és l'única font que provoca la presència de sal en el colorant final. Les **impureses salines en els colorants** tenen quatre **orígens** diferents:

-*Matèries primeres*: Les matèries primeres utilitzades no són pures al 100 % i poden tenir nivells de sal de fins el 20-30 %.

-*Subproductes de síntesi*: En la síntesi dels colorants azoics es genera sal com a subproducte.

-*Precipitació del colorant*: Després de la síntesi s'afegeix sal per separar el colorant de l'aigua i procedir al seu assecatge posterior (Fig. 1). Tradicionalment aquesta precipitació del colorant s'ha fet per addició de clorur sòdic (entre un 5 i un 25 % del volum de la massa de reacció).

-*Agents de cupatge*: Per ajustar la força comercial del colorant s'afegeixen diferents agents de cupatge, entre ells sals inorgàniques.

Aquestes impureses iòniques en els colorants poden provocar tintures desigualades (en la pell es detecten zones amb intensitats de color diferents). Per minimitzar aquests efectes i millorar la qualitat del producte final és imprescindible un bon control de les matèries primeres i del procés de fabricació, així com la purificació del colorant (28).

Sovint, també és interessant identificar els **contaminants** presents en **àcids comercials**. Pel que fa a les **impureses** d'àcids orgànics, com és el cas de l'àcid fòrmic, poden determinar-se per HPLC, CG o electroforesi capil·lar. Però només s'ha trobat a la literatura metodologia amb electroforesi capil·lar (25). En el cas de l'àcid fòrmic els contaminants més habituals són sulfats i clorurs.

Freqüentment en els **sintans** comercials es determina el **contingut de sulfats**. No existeix un mètode oficial per a aquesta anàlisi. S'utilitza amb molta eficàcia l'electroforesi capil·lar d'una dissolució diluïda del taní sintètic, emprant-se calibrat amb patró intern, generalment de molibdat amònic (1). Alguns sintants arriben a tenir fins un 50% en pes de sulfat sòdic.

En definitiva, un excés d'impureses aniòniques en els productes químics comercials és indesitjable perquè pot provocar efectes negatius en les pells adobades, tals com tintures desigualades (esmentades anteriorment) i eflorescències salines (veure secció 2.3). D'altra banda, els anions no absorbits per les pells incrementen la salinitat de les aigües residuals i aquestes requeriran un major tractament (apartat 2.4).

2.3. Components aniònics en el cuir (1)

La pell adobada és un material complex format per un substrat fibrós de naturalesa proteica denominat substància pell. A aquest substrat se li han incorporat desenes de substàncies individuals amb diferents finalitats. Algunes d'aquestes substàncies s'han combinat químicament amb el substrat i d'altres només s'han dipositat físicament en els espais interfibril·lars de forma que són eliminables mitjançant rentat amb aigua.

Els components majoritaris del cuir es poden classificar en set grups:

1. Substància pell
2. Matèries grasses
3. Humitat
4. Substàncies inorgàniques solubles en aigua
5. Substàncies inorgàniques insolubles en aigua
6. Substàncies orgàniques solubles en aigües
7. Substàncies orgàniques insolubles en aigua

La majoria de substàncies aniòniques que conté el cuir són solubles i es poden extreure per rentat. És el cas de clorurs, sulfats, formiats, i espècies similars. Altres, com fosfats o silicats, poden estar en forma insoluble, bé per la seva combinació amb el col·lagen participant com a agent adobant o readobant o perquè formen sals i substàncies insolubles.

Un contingut elevat d'anions solubles en el cuir no és convenient. L'excés de sals solubles pot provenir principalment de productes químics emprats en el procés i/o de productes que s'han generat durant l'adobament que no s'han fixat o eliminat adequadament. **Les sals solubles són problemàtiques** perquè poden contribuir a la corrosió dels objectes metàl·lics en contacte amb el cuir, poden originar taques per migració a la superfície i altres **efectes**:

- L'excés de sals solubles no fixades migra amb facilitat a la superfície del cuir i pot originar l'aparició de taques (fenomen conegut en els cuirs com eflorescències salines). L'aparició d'eflorescències és un dels defectes més comuns en l'empenya de sabata. A més del perjudici estètic, pot proporcionar duresa i fragilitat, facilitant l'aparició de fissures i trencaments de flor, escurçant la vida de la sabata.
- En els cuirs per sola de sabata constitueixen una càrrega que es va desprenent per lixiviació en temps humit, empitjorant progressivament la resistència a l'aigua.
- L'anió clorur eluït del cuir es considera un dels principals factors desencadenants de la corrosió dels objectes metàl·lics en contacte amb la pell adobada. Un dels paràmetres que s'ha de controlar en la recepció de les pells piquelades és, segons l'associació Anglesa de Químics i Tècnics del Cuir, el contingut en clorur sòdic.

Existeixen diverses normes de qualitat, directrius i recomanacions d'exigències mínimes que fan referència al contingut aniònic en diferents pells i articles de pell.

La Taula 3 cita els **mètodes oficials** relacionats amb **l'anàlisi química de substàncies aniòniques en el cuir** (1,29).

Determinació de substàncies del cuir que presenten components aniònics (o de paràmetres relacionats)		
Substància	Fonament del mètode	Ref. o Norma
Determinació de les matèries orgàniques i inorgàniques solubles en aigua	Gravimetria de les matèries extretes	IUC 6, (EN ISO 4098) ASTM D-2876
Cendres	Gravimetria	IUC 7 (EN ISO-4047)
Acidesa pH de l'extracte aquós	Potenciometria (elèctrode combinat de vidre)	IUC 11
Clorurs	Valoració amb nitrat de plata	ASTM D 4653-87
Sulfats	Gravimetria	ASTM D 4655-87
Cr(VI) determinat com a anió cromat	Espectrofotometria VIS	EN ISO 17075

Taula 3. Relació de mètodes oficials relacionats amb l'anàlisi química de substàncies aniòniques en el cuir (1,29)

El pH de l'extracte aquós del cuir és un paràmetre que també està relacionat amb els components aniònics de la pell. Els àcids que conté el cuir acabat determinen el pH del seu extracte aquós. Les normes i directrius de qualitat estableixen que el pH del cuir acabat no ha de ser inferior a 3,5, degut als problemes que comporta l'acidesa. L'excés d'acidesa en el cuir acabat afavoreix la corrosió d'objectes que estan en contacte amb ell. També pot provocar problemes si el cuir està en contacte directe i permanent amb la pell de l'usuari, per exemple en calçat i guanteria. D'altra banda, un pH molt baix pot ocasionar la pèrdua de la resistència mecànica del cuir degut a l'atac de l'àcid sobre les fibres.

En el cuir no és convenient la presència d'àcids forts lliures. L'índex diferencial és un indicador de la força dels àcids lliures presents en la pell, i no pot ser mai superior a la unitat. Aquest paràmetre es determina per diferència entre el pH de l'extracte aquós del cuir i el pH del mateix després de diluir-lo 1:10. Si la diferència entre aquests dos valors de pH de l'extracte del cuir és superior a 0,7, la solució conté àcids forts, com per exemple el sulfúric, que són més perjudicials. Si el valor és menor, es tractarien d'àcids orgànics, no perjudicials.

Els anions orgànics no poden determinar-se de forma eficaç en el cuir amb els mètodes clàssics, però no hi ha mètodes oficials publicats per a l'anàlisi d'aquests analits mitjançant tècniques instrumentals. Els mètodes instrumentals que permeten identificar i quantificar simultàniament les substàncies aniòniques extretes del cuir són la cromatografia iònica i l'electroforesi capil·lar (1). Aquestes tècniques són adequades per a anions orgànics i inorgànics.

En aquest àmbit, s'han trobat dues publicacions que analitzen simultàniament anions en pells mitjançant cromatografia iònica amb detecció conductimètrica i l'electroforesi capil·lar:

- L'any 1992 Chonan i els seus col·laboradors (30) utilitzen la cromatografia iònica amb detecció conductimètrica per examinar la composició dels ions extrets del cuir a diferents temperatures. Els anions que van detectar en les diferents mostres analitzades van ser: clorur, sulfat, nitrat, lactat, acetat.
- En la mateixa època, W.R Jones i P. Jandik empen l'electroforesi capil·lar per a l'anàlisi d'anions en el cuir (31,32).

D'altra banda, és d'especial interès l'estudi de la presència de crom hexavalent en els cuirs. El Cr(VI) es determina en les pells com a anió cromat. Degut a les seves peculiaritats i a les noves restriccions imposades per la UE, al crom hexavalent se li ha dedicat un apartat específic, el punt 2.5.

2.4. La salinitat en les aigües residuals d'adoberia

Les adoberies han estat tradicionalment considerades activitats amb una incidència mediambiental important. Per la seva pròpia naturalesa, els processos del sector exigeixen una gran quantitat d'aigua i impliquen l'ús de productes químics.

El principal problema de contaminació d'aquesta activitat es troba en les aigües, i, dins les aigües, els processos de ribera i d'adobament són amb diferència els que aporten major càrrega contaminant.

Aquest sector ha estat i continua estant sotmès a creixents pressions per ajustar-se a les normes ambientals, que són cada cop més estrictes en tots els països. Per tant, molts dels empresaris del sector busquen maneres alternatives de gestió de recursos que permetin modificar els processos d'elaboració per garantir la sostenibilitat de la indústria manufacturera en el futur. Cal buscar l'equilibri entre la necessitat de reduir al mínim la contaminació i els beneficis que s'obtenen de la indústria de la pell (33).

Això explica l'interès creixent d'aquest sector per minimitzar l'impacte ambiental dels seus processos: s'han realitzat molts estudis i s'han posat en marxa nombroses iniciatives en aquest àmbit, tant de manera particular com col·lectiva (17,22,34-46).

La majoria de projectes i recerques en matèria de gestió de l'aigua s'han dirigit a les fases de ribera i a la d'adobament, que són les que tenen un major consum d'aigua (aproximadament el 75% del total de l'aigua consumida) i les que generen més càrrega contaminant.

Un dels **principals problemes de les aigües residuals** de les adoberies és la **salinitat**. De tots els contaminants presents en la pell i afegits durant el procés, només les sals resten inalterades després dels tractaments en les depuradores. Una salinitat elevada en els abocaments de fàbrica és indesitjable per diversos motius (43):

- Disminueix la solubilitat de l'oxigen en l'aigua, i per tant disminueix la capacitat d'autodepuració natural del medi receptor.
- Es redueix la possibilitat d'utilitzar l'aigua en regadius o com alimentació per a plantes potabilitzadores (caldrien instal·lacions sofisticades per eliminar la sal).
- Augmenta el valor del paràmetre de sals sòlides solubles, un dels sis paràmetres emprats en el càlcul del Cànon d'abocament (47,48).

També cal considerar l'efecte negatiu d'un excés de salinitat en les EDARs:

- La salinitat pot modificar el creixement dels microorganismes perquè influeix en els processos metabòlics. S'alteren els processos de transferència degut a les diferències de pressió osmòtica (43).
- Si la conductivitat d'un aigua residual supera els 15000 microsiemens, les sals disminueixen l'activitat bacteriana en el tractament biològic i es produeix un rendiment baix en la depuració (42,44).

La salinitat és un paràmetre difícil de corregir en aigües residuals, per la qual cosa el seu millor tractament és la prevenció.

L'origen de la salinitat en les aigües residuals de les adoberies es troba bàsicament en els productes químics emprats en diferents etapes del procés. Les principals **fonts de salinitat** són:

- *Sal* utilitzada en els escorxadors *per conservar les pells* (clorur sòdic), que en les operacions de remull acaba en les aigües residuals.
- *Sals neutres per evitar l'inflament àcid* (clorur sòdic i sulfat sòdic) i àcids afegits en el piquelat per preparar les pell per a l'adobament (45).
- Amb una contribució menys important que els dos factors anteriors, però que a mesura que aquests estan sent neutralitzats s'han d'anar tenint en compte, són les *càrregues de sals neutres que porten alguns productes* com ara sintètics, dispersants, colorants i fins i tot olis sulfatats.

Els **anions que més contribueixen a la salinitat** són els **sulfats** i els **clorurs** (Taula 4), i és per això que tenen limitada la concentració d'abocament a xarxes de sanejament i a la llera pública. S'ha determinat que el tractament d'1 tona de pell aporta uns 300kg

de sals a les aigües residuals, dels quals 175 corresponen a sals que contenen l'aníó clorur, 100 a sulfats (bàsicament de sodi o calci) i 25 a sals que contenen altres anions (42).

Anió	Origen principal
Cl^-	<ul style="list-style-type: none"> -Conservació -Salmorra del píquel -Càrregues de productes químics
SO_4^{2-}	<ul style="list-style-type: none"> -Àcid sulfúric del píquel -Sulfats en desencalants i rindents -Sals de crom adobant (sulfat bàsic de crom) -Càrregues de productes químics -Oxidació del sulfhidrat de ribera

Taula 4. Origen dels anions clorur i sulfat en els abocaments aquosos d'una adoberia

Els clorurs són molt solubles i per tant, no es veuen afectats durant el tractament de depuració de l'aigua. Els sulfats precipiten en el tractament depurador perquè la seva sal càlcica és poc soluble; tot i que la seva solubilitat és suficientment elevada com per mantenir un valor de fins 250 mg/L en aigües depurades.

Salmerón (44) també relaciona la salinitat d'un aigua residual tractada amb la seva qualitat per a usos posteriors agrícoles. Indica que els ions poden intervenir en fenòmens osmòtics i afecten els equilibris de membrana de les cèl·lules vegetals, de manera que un excés pot pertorbar la presa de nutrients del terra a través de les arrels.

Es coneixen diverses **mesures per disminuir la salinitat** en les etapes més conflictives:

-CONSERVACIÓ

La principal alternativa per evitar la sal de conservació és treballar amb pells fresques o seques, però no sempre és possible (22,33,45,49-51):

- L'assecatge és un mètode de conservació només aplicable a pells petites.
- No existeix una xarxa fiable i constant per transportar pells fresques dels escorxadors a les adoberies.

-PÍQUEL

Les actuacions més importants per disminuir la salinitat en el píquel són (45):

1. Suprimir el piquelat (factible per a pells fines) i acidificar en l'adobament.
2. Piquelar amb banys curts i àcids orgànics.
3. Reciclar el bany de píquel separadament, prèvia filtració o decantació i addició dels components que calguin abans de reutilitzar-lo.
4. Reciclar el bany de píquel – adobament.

S'observa que les mesures recomanades per disminuir la salinitat són preventives i no correctores, ja que es tracta d'un paràmetre difícil de corregir en aigües residuals (22,39,52).

D'acord a la **legislació vigent**, els abocaments d'aigües residuals es regulen en funció del medi receptor. No existeixen uns límits fixos d'abocament a la llera pública. La legislació espanyola pren com a referència la Taula 3 del Real Decreto 849/1986 de 11 d'abril (53). Segons aquesta normativa, els paràmetres que s'han de considerar en l'estimació del tractament de l'abocament, i que es troben relacionats amb els possibles anions presents en aigües residuals d'adoberia, són: clorur, sulfur, sulfat, fluorur, nitrogen nítric i fòsfor total.

Respecte els límits d'abocament d'aigües residuals als sistemes públics de sanejament, generalment s'ajusten a les corresponents ordenances municipals o bé als reglaments de les entitats gestores d'aquests sistemes.

En resum, a nivell empresarial és important la reducció i el control de la salinitat per complir els requisits d'abocament i per disminuir la tarifa del Cànon de sanejament (47,48).

Els **mètodes d'anàlisi d'efluents i aigües tractades d'adoberia** no difereixen dels emprats per a qualsevol altre tipus d'aigües residuals. Segons Font (1) no ha calgut l'elaboració de normes ni mètodes específics pel sector. Els mètodes oficials per a l'anàlisi d'aigües residuals són les normes UNE EN ISO. Molts dels mètodes UNE procedeixen dels mètodes originals Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (54).

Després de consultar la normativa UNE vigent (55) s'ha trobat que hi ha un total de disset normes relacionades amb l'anàlisi d'anions en aigües, de les quals tres són mètodes cromatogràfics. Les catorze normes restants són mètodes no cromatogràfics (volumetries, anàlisi d'injecció de flux (FIA), potenciometria, espectrofotometria i conductimetria). Les normes UNE per a la determinació d'anions en aigua per cromatografia iònica no són específiques per a cap sector industrial en concret. Es citen a continuació:

- UNE-EN ISO 10304-1:2009. Calidad del agua. Determinación de aniones disueltos por cromatografía iónica en fase líquida. Parte 1: Determinación de bromuro, cloruro, fluoruro, nitrato, nitrito, fosfato y sulfato en aguas residuales (ISO 10304-1:2007).
- UNE-EN ISO 10304-3:1997. Calidad del agua. Determinación de aniones disueltos por cromatografía iónica en fase líquida. Parte 3: Determinación de cromato, ioduro, sulfito, tiocianato y tiosulfato (ISO 10304-3:1997).
- UNE-EN ISO 10304-4:1999. Calidad del agua. Determinación de aniones disueltos por cromatografía iónica en fase líquida. Parte 4: Determinación de clorato, cloruro y clorito en aguas débilmente contaminadas (ISO 10304-4:1997).

Aquestes tres normes s'engloben en una, la ISO 10304, dividida en tres parts i sota el títol general : "Calidad del agua. Determinación de aniones disueltos por cromatografía de iones en fase líquida".

D'aquestes normes, la més relacionada amb els anions que incrementen la salinitat en les aigües residuals d'adoberia és la Part 1 (UNE-EN ISO 10304-1:2009). Com s'ha indicat anteriorment, no és específica per a cap sector industrial en concret. Proporciona orientacions generals per a l'anàlisi que s'han d'adaptar i optimitzar a cada mostra en concret i a cada equip cromatogràfic. La norma es refereix a la determinació d'anions per cromatografia iònica emprant el detector conductimètric preferentment. Es comenta amb més detall a l'apartat 3.7.1.

A la literatura s'han trobat algunes publicacions basades en **mètodes instrumentals per determinar anions en mostres d'aigües residuals d'indústries d'adoberies**:

- Fiehn i altres, l'any 1998 (56), determinen anions en aigües residuals d'adoberia per electroforesi capil·lar i detecció fotomètrica. Per solventar els problemes que causa l'elevat contingut salí en la separació, eliminen prèviament els anions clorur i sulfat mitjançant intercanvi iònic.
- Li Bo i els seus col·laboradors han publicat diversos articles referents a la determinació d'anions en efluent d'adoberies, però cap d'ells basat en la cromatografia iònica (57-61). Empren la nefelometria, l'anàlisi per injecció de flux i la cromatografia de baixa pressió. En la comunicació de l'any 2009 (57) presenten un nou aparell basat en la cromatografia d'exclusió a baixa pressió que permet determinar simultàniament clorurs i sulfurs en efluent d'adoberia. La detecció espectrofotomètrica emprada requereix una derivatització post columna. El preu del nou aparell, segons els seus inventors, és d'uns 4000 dòlars. Tot i la novetat d'aquest instrument, no es considera una alternativa a la cromatografia iònica en els laboratoris del sector adober.

2.5. El crom hexavalent en la pell

El procés d'adobament al crom és el més àmpliament utilitzat per la indústria de la pell. Aproximadament el 90% de la producció mundial **es curteix amb sals de crom (III)** (12,13). Aquest tipus d'adobament es caracteritza per proporcionar al cuir una àmplia gama de propietats que el fan adequat per a molts articles finals.

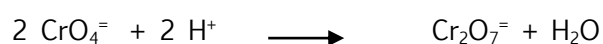
Els compostos de crom tenen diferent nivell de **toxicitat segons el seu estat d'oxidació**. L'estat trivalent, que és el que té poder adobant, es considera no tòxic i es reconeix el seu caràcter necessari per l'ésser humà com a oligoelement. Però, el crom també existeix en altres estats d'oxidació i, entre ells, el de crom hexavalent, Cr(VI).

El crom hexavalent és la forma nociva de l'element i pot originar-se, en determinades condicions extremes, per oxidació del crom trivalent.

Tot i que en el procés d'adobament s'empra crom trivalent, la possible formació de crom hexavalent en pell curtida és un tema de gran preocupació degut als seus efectes sobre la salut humana i el medi ambient. El **Cr(VI)** és considerat altament **tòxic**, de caràcter **cancerigen** i presenta **risc d'inducció de sensibilització** de la pell humana relacionat amb un contacte directe o indirecte amb articles de cuir. És conegut que causa forta dermatitis de contacte en els éssers humans. No obstant això, segons alguns autors, tot i reconeixent que efectivament el crom (VI) és sensibilitzant, no s'ha trobat cap evidència de que la sensibilitat que algunes persones tenen als objectes de pell sigui deguda al possible Cr(VI) que conté, ja que aquest contingut és de concentracions molt baixes (62). La prohibició que la Comissió Europea ha establert a les pells amb contingut de Cr(VI) està basada en el principi de precaució, i la restricció de 3 mg/kg té a veure amb el límit de quantificació del mètode analític.



El **crom hexavalent** es refereix a **compostos químics** que contenen l'element crom en l'estat d'oxidació (VI): òxid de crom i diverses sals de cromat o de dicromat. El crom amb estat d'oxidació (VI) no existeix com a catió i forma anions estables com el cromat CrO_4^{2-} , de color groc, a pH bàsic o neutre. En mitjà àcid capta una altra molècula de cromat originant l'anió dicromat $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, vermell-taronja.

L'existència del crom hexavalent en forma de cromat o dicromat depèn del pH del medi (63)(64):



En les **pellis adobades**, el possible **crom Cr(VI)** s'extreu i **es determina com a anió cromat**.

A la Taula 5 es presenta un resum de la investigació de Tegtmeier D. i Kleban M. sobre la toxicitat del Cr(III) i el Cr(VI) i els equilibris entre els dos cations en el cuir (12).

Comparativa toxicitat Cr (III) i Cr (VI)	
<p>Crom trivalent, Cr (III)</p>  <p>-No perillós segons el reglament CLP.</p>	<p>Crom hexavalent, Cr (VI)</p>  <p>-Tòxic per ingestió. -Cancerígen i mutagènic per inhalació. -Sensibilitzador. Alergènic per contacte amb la pell.</p> <p>(La inhalació i la ingestio no són vies d'exposició previsibles en el cuir, excepte en cas d'ingestió que es pot preveure només en el cas de nens petits).</p>
Resum de la teoria sobre l'equilibri entre el Cr(III) i el Cr(VI)	
<p>En forma dissolta, existeix un equilibri redox entre el Cr(III) i el Cr(VI). En condicions normals de la matriu cuir (pH 3,5-5, temperatures inferiors a 100 °C i concentracions de Cr(III) extraïble de 50-500 ppm) es troba casi completament en la forma trivalent (les estimacions es refereixen a un factor significativament major que 10000:1).</p>	$\text{Cr (III)} \xrightleftharpoons{>>10000} \text{Cr (VI)} + 3e^-$
<p>La major part del crom en el cuir es fixa fortament amb el col·lagen durant l'adobament. El crom fixat (complex Cr-col·lagen) redueix significativament la disponibilitat del crom per l'equilibri redox. Només la part extraïble de Cr(III) en el cuir es troba completament lliure per l'equilibri.</p>	$\text{Cr(III) fixat} \xrightleftharpoons{3-4\%} \text{Cr(III)} \xrightleftharpoons{\text{extraïble 200 ppm}} \text{Cr (VI)} + 3e^-$ <p style="text-align: center;">3-4% extraïble 200 ppm < 3ppm</p>
<p>El Cr(III) fixat només comença a oxidar-se directament a Cr(VI) sota condicions extremes.</p>	$\text{Cr (III)} \xrightleftharpoons{> 800^\circ \text{C}} \text{Cr (VI)} + 3e^-$
<p>Un mecanisme de radicals pot reduir l'entalpia de reacció i accelerar la oxidació (per exemple: exposició a radiacions UV, processos de blanqueig o determinats engreixants). Per evitar-ho poden utilitzar-se antioxidants o captadors de radicals, o bé evitar els esmentats productes químics problemàtics</p>	$\text{Cr (III)} + 3 \text{ R-O}^\cdot \rightarrow \text{Cr (VI)} + 3 \text{ R-O}^-$ <p style="text-align: center;">> 50 °C</p>

Taula 5. Toxicitat del Cr(III) i Cr (VI) i equilibris químics dels cations de crom segons Tegtmeier D. i Kleban M.(12)

La Fig. 2 mostra el diagrama de Pourbaix del crom (65,66). Aquest gràfic permet identificar l'espècie termodinàmicament estable a diferents valors de potencial i de pH.

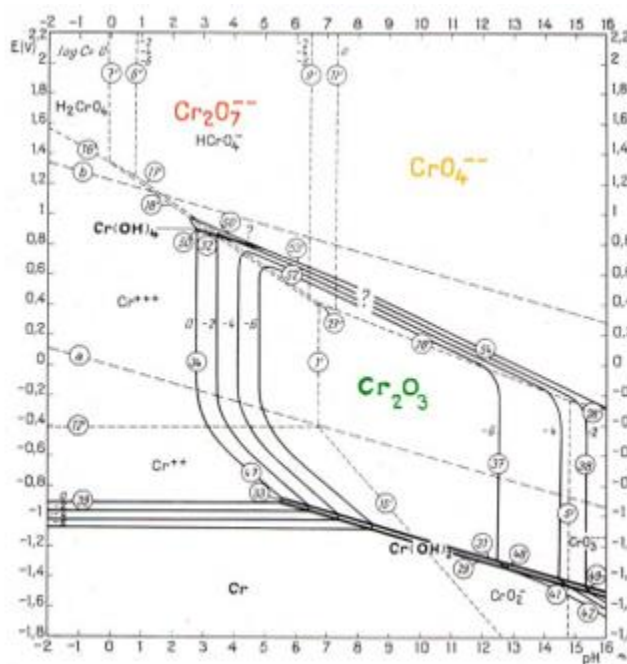


Fig. 2. Diagrama de Pourbaix (65)(66)

L'aprofundiment en les **causes de formació de Cr(VI)** en el producte final de pell i les propostes de millora per evitar-ne la transformació del crom trivalent a hexavalent han estat motiu d'interès per a molts autors (12,67).

El procés de curtició al crom va ser la base d'un rigorós estudi promogut des de la UE, el projecte "Chrome6less" (67). Els resultats d'aquest projecte van concloure que és possible evitar la generació de crom hexavalent en el cuir final. L'estudi ofereix bones pràctiques per prevenir la formació de Cr(VI). També recentment INESCOP va presentar els resultats del projecte "Prevención de cromo hexavalente en pieles para calzado" (68).

Encara que es coneixen les directrius i **recomanacions per prevenir la formació de crom hexavalent** en el procés de transformació de les pells, resumides a la Taula 6 (11,12,50,67,68), existeix un risc potencial de formació de crom (VI) durant la producció en casos on les adoberies no operin correctament.

Resum de bones pràctiques i recomanacions per prevenir la formació de crom hexavalent	
Matèries primeres	Confirmar mitjançant anàlisis que no existeixin traces de Cr(VI) en les sals comercials de crom utilitzades en el procés ni en les pells wet-blue (en cas de processar pells ja adobades).
En l'adobatge	<p>-Exigir al proveïdor de productes de crom procedents de fora de la UE, un certificat d'absència de crom hexavalent.</p> <p>-Realitzar la dosificació de les sals de crom d'acord a les formulacions, evitant afegir quantitats superiors a les indicades.</p> <p>-Establir un període de repòs de les pells en wet-blue de menys de 24 h fins continuar el seu processat amb l'objectiu de millorar la fixació del crom al col·lagen de la pell.</p>
En el neutralitzat	Finalitzar la fase humida a pHs àcids, entre 3,5 i 4, mitjançant àcid fòrmic i rentar seguidament el cuir.
En el readobament	Utilitzar entre 1-3 % d'extracte tànnic per proporcionar protecció antioxidant.
En la tintura	Evitar l'ús d'amoníac en la tintura .
En l'engreix	Avaluar, abans del seu ús, la influència dels agents engreixants d'origen natural en la formació de Cr (VI).
En l'acabat	Evitar completament l'ús de pigments inorgànics cromats (grocs i ataronjats).
En la pell acabada	<p>-Exigir als laboratoris químics l'aplicació del mètodes oficials vigents per a la determinació de Cr(VI).</p> <p>-Realitzar anàlisis químiques periòdiques del contingut del Cr(VI) de les pells produïdes, principalment quan es realitzin modificacions en els reactius, les formulacions i les condicions d'operació durant el procés.</p>
Emmagatzematge i transport	-En pells wet-blue evitar l'emmagatzematge a la intempèrie abans del seu processament (la radiació UV té incidència en la formació de Cr(VI)).

Taula 6. Resum de les directrius per prevenir la formació de crom hexavalent en el procés de fabricació i en la pell adobada (11,12,50,67,68)

A causa del seu nivell de toxicitat, ja comentat anteriorment, existeix **normativa** que regula els **límits de contingut de crom hexavalent a les pells**.

El crom hexavalent és una de les substàncies restringides que apareixen en les llistes RSL (llistes de substàncies restringides) de moltes marques de roba i calçat. A més, el crom (VI) és un dels criteris de les etiquetes ecològiques no governamentals pels articles de cuir. Aquestes etiquetes ecològiques i les llistes RSL especifiquen que no ha de detectar-se crom (VI) en la mercaderia dirigida al consumidor. Atès que el límit de detecció de crom (VI) en el mètode oficial (ISO 17075) és 3 mg/kg en pes sec, el contingut de crom hexavalent en cuir ha de ser indetectable, és a dir, per sota de 3 mg/kg. El triòxid de crom i alguns altres compostos de crom (VI) (àcids generats a partir de triòxid de crom i els seus oligòmers, dicromats i cromats) es van incloure en la llista d'autorització de REACH (annex XIV) en abril de 2013 (69).

D'altra banda, el 25 de març de 2014, la Comissió Europea va emetre una esmena que modificava el Reglament REACH afegint nous requisits químics pels compostos de Cr(VI) en articles de cuir (11).

La restricció proposada es centra en el risc d'inducció de sensibilització de la pell relacionat amb un contacte directe o indirecte amb articles de cuir o articles amb parts de cuir que contenen crom (VI). D'acord amb aquesta normativa, els articles de cuir o que contenen peces de cuir que entren en contacte amb la pell de l'usuari, no han de comercialitzar-se quan tinguin un contingut de crom (VI) igual o superior a 3 mg/kg del pes sec total del cuir o la part de cuir. Aquesta restricció es va fer efectiva l'1 de maig de 2015 (70).

La nova legislació aclareix la confusió que existia sobre el límit de Cr(VI) i unifica criteris. La Unió Europea ha estat capdavantera en l'establiment de limitacions en el contingut de crom hexavalent en articles de pell, ja en 1994 va incloure especificacions del contingut de crom hexavalent en la Norma EN 420 sobre guants de seguretat laboral, limitant-lo a un màxim de 2 mg/Kg. Cal esmentar que per aquelles dates Alemanya era l'únic país que tenia una legislació que restringia el Cr(VI) en pells: el nivell màxim permès era de 3 mg/Kg (limitació del mètode d'assaig, any 1996). L'any 2002 la Comissió Europea va publicar una Decisió (2002/231/CE) on s'establien els criteris ecològics per a la concessió de l'etiqueta ecològica comunitària per al

calçat. En aquest document, el nivell recomanat pel Cr(VI) era com a màxim 10 mg/kg. És amb aquest valor quan va sorgir la confusió sobre el límit per al Cr(VI). Les noves restriccions al Cr(VI) imposades per la UE a través del reglament REACH unifiquen criteris. La Fig. 3 resumeix cronològicament les limitacions europees al Cr(VI) en pell.

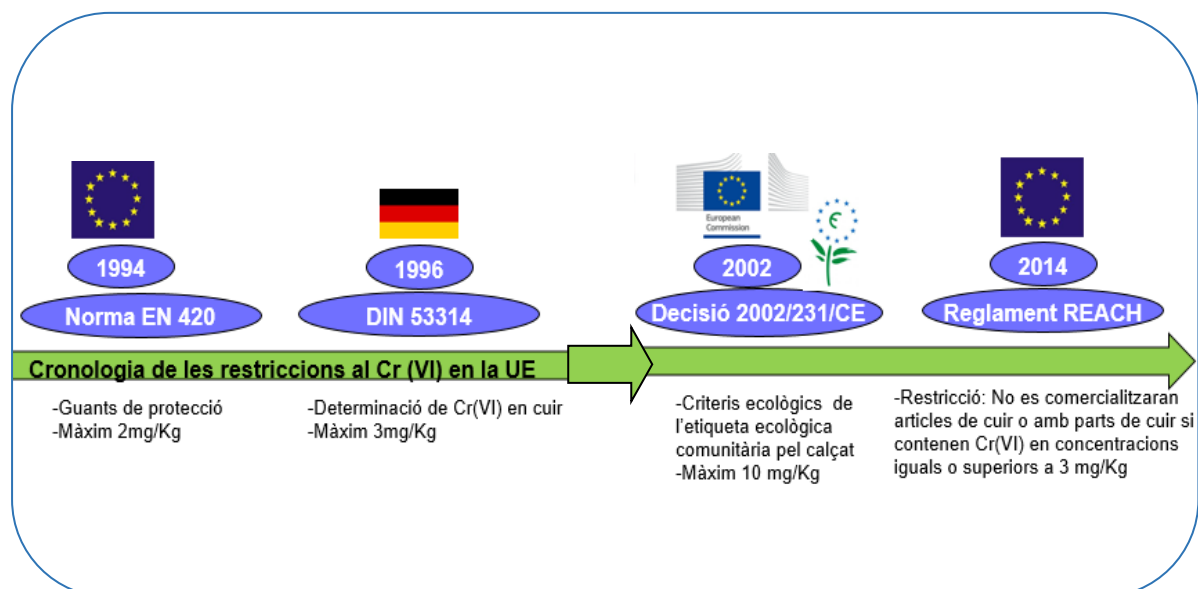


Fig. 3. Cronologia de les restriccions al Cr (VI) en pell

Fins el 2017, la **determinació de crom hexavalent en cuirs** s'ha realitzat segons la norma EN ISO 17075:2007 (10), basada en un mètode colorimètric. Tot i que aquest procediment té l'avantatge de no requerir una inversió significativa en equips i manteniment tècnic, també presenta una sèrie d'inconvenients tals com elevada incertesa i possibles falsos positius, que es discutiran en els apartats 8.2 i 8.12.2.

A causa de les limitacions del mètode colorimètric per a la determinació de crom (VI), els centres d'investigació i comitès d'anàlisi han dedicat esforços a la recerca d'un nou mètode alternatiu. S'han proposat diverses tècniques d'anàlisi tals com espectrometria d'absorció atòmica (16), electroforesi capil·lar (17), voltamperometria (18,19) i espectrofotometria d'injecció de flux (20,21). Aquestes metodologies no s'han adoptat com a mètodes oficials pels comitès internacionals per varies raons: manca de fiabilitat, lentitud, elevada inversió en equipaments i alta incertesa, entre altres.

S'han trobat poques referències sobre la determinació de Cr(VI) per cromatografia iònica, i aquestes utilitzen la derivatització post-columna. A la secció 3.7.3 es detallen.

L'interès en trobar un nou mètode alternatiu va créixer amb la nova restricció imposada al Cr (VI) i la seva aplicació a partir de l'1 de maig de 2015. L'enduriment de les restriccions al crom (VI) no només afecta als adobers europeus, sinó que els exportadors de pells internacionals que vulguin introduir cuirs i objectes manufacturats amb cuir a la UE també hauran d'adaptar-se als nous requisits.

El **Capítol 9** presenta el **desenvolupament** d'un nou **mètode**, basat en la cromatografia d'intercanvi iònic, que permet mesurar el crom hexavalent d'una manera més simple, ràpida i fiable que el mètode colorimètric ISO 17075:2007.

2.6. Visió de les metodologies d'anàlisi d'anions

Els anions poden determinar-se per mètodes tradicionals o instrumentals. Els principis teòrics de l'anàlisi d'anions per ambdós tipus de metodologies estan molt documentats en la literatura general de química analítica (71–79).

Els mètodes instrumentals presenten avantatges tals com major precisió, especificitat, sensibilitat i rapidesa en els resultats (75,76). La majoria quantifiquen anions de manera individual; d'altres proporcionen informació sobre contingut global d'ions en la mostra (pHmetria, conductimetria). Els **mètodes** analítics instrumentals **que permeten la detecció i quantificació simultània** de diversos **anions** són la cromatografia d'alta resolució i l'electroforesi capil·lar (80).

Els principals inconvenients de l'electroforesi capil·lar (CE) en comparació amb la CI són menor sensibilitat, menor robustesa i pobre reproductibilitat en anàlisi qualitativa i quantitativa a causa de la inestabilitat del flux electroosmòtic (80,81).

Actualment, la **cromatografia iònica** esdevé la **millor tècnica per l'anàlisi d'ions**. És un tipus de cromatografia líquida d'alta resolució que es fonamenta en l'ús de resines d'intercanvi iònic. La CI permet detectar i quantificar simultàniament anions i cations de manera eficaç, ràpida i reproducible. L'instrumental necessari en cromatografia iònica per determinar anions és un cromatògraf típic de líquids (HPLC) amb una columna específica (2–5,82). En el Capítol 3 es resumeix el fonament d'aquesta tècnica.

En els apartats anteriors d'aquest capítol ja s'ha presentat la situació actual de l'anàlisi d'anions en el sector adober en diferents mostres i la revisió de les publicacions basades en mètodes instrumentals aplicats als anions d'adoberia.

La recerca a la literatura ha posat de manifest la **manca de procediments normalitzats específics per a l'anàlisi d'anions en el sector adober mitjançant cromatografia iònica** (la millor tècnica per a aquestes determinacions). Així mateix, hi ha poques publicacions sobre l'anàlisi d'anions per CI en aquest sector. Les publicacions trobades basades en mètodes instrumentals empren principalment l'electroforesi capil·lar i la cromatografia:

- Només s'ha trobat un article, de l'any 1992 (30), que examina la composició iònica dels extractes de cuir a diferents temperatures amb CI i detector conductimètric.
- Hi ha antecedents de detecció d'anions no cromòfors amb detecció fotomètrica indirecta en electroforesi capil·lar (25).
- Les poques referències trobades sobre anàlisi de crom hexavalent en mostres de cuir utilitzen la CI amb derivatització post-columna o bé l'ASE-IC (extracció accelerada amb solvent en combinació amb la cromatografia iònica) també amb derivatització post-columna (83-86). (Veure apartat 3.7.3).

Pel fet que en aquest treball es pretén desenvolupar metodologia ràpida i fiable per a la determinació d'anions i al mateix temps optimitzar al màxim els recursos existents en un laboratori del sector adober, la cerca bibliografia s'orienta a partir d'ara cap a la cromatografia iònica amb detector UV, el més populars dels detectors, tal com s'ha explicat a l'apartat 1.1.

En el següent capítol es presenten els fonaments de la tècnica cromatogràfica. També s'aprofundeix en les condicions experimentals emprades pels autors que han determinat anions per CI tant en el sector adober com en altres. Aquesta recerca a la literatura permetrà establir unes condicions com a punt de partida del desenvolupament de metodologia d'aquest treball (apartat 3.7 i els seus subapartats).



Capítol 3. La cromatografia iònica

3.1. Introducció

La cromatografia és una important tècnica de separació i quantificació dels analits d'una mostra. Existeixen diferents varietats de mètodes cromatogràfics (5,71), una d'elles és la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Els diversos tipus d'HPLC es diferencien en el mecanisme emprat per a la separació dels analits.

La cromatografia iònica (CI) és un tipus de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) que es fonamenta en l'ús de resines d'intercanvi iònic.

En els últims 35 anys, la tècnica HPLC ha esdevingut el mètode de separació analític per excel·lència i s'utilitza en un ampli rang d'activitats industrials, científiques i acadèmiques, tals com l'anàlisi d'aliments, drogues, agroquímics, aigües... El cromatògraf líquid és el tercer equipament estàndard en els laboratoris analítics, després de les balances i els potenciòmetres. Les noves tècniques d'HPLC identifiquen, purifiquen i quantifiquen, essent de gran rellevància en gairebé totes les àrees d'anàlisi instrumental pels grans avantatges que aporten (2-5,71,82,87,88).

Els **components** clau d'un **sistema cromatogràfic** (Fig. 4) són la fase estacionària (columna), la fase mòbil (eluent) i el detector. Si l'eluent i la columna no són els adequats per als analits a determinar, aquests no poden separar-se, i si no s'empra el detector adequat, és impossible diferenciar els components de la mostra.

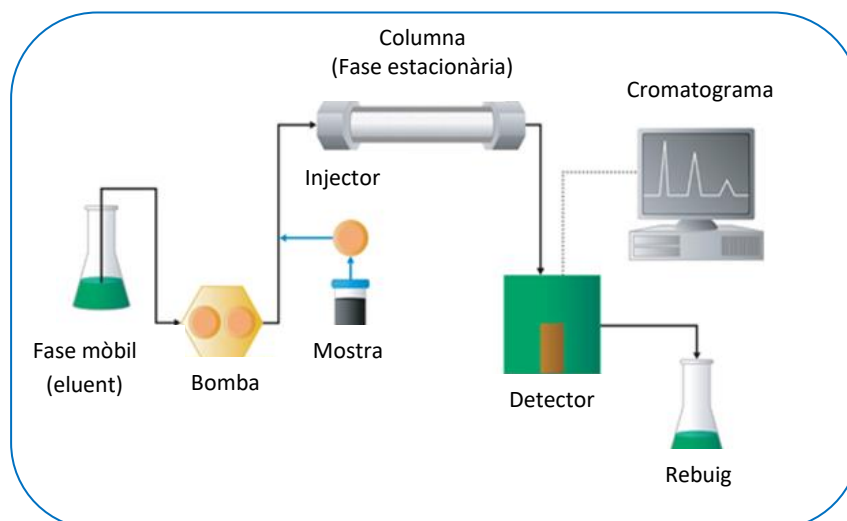


Fig. 4. Principals components d'un sistema cromatogràfic HPLC

La selecció del tipus de cromatografia es realitza en funció de la naturalesa de les substàncies a separar. Cal escollir fases estacionàries, fases mòbils i detectors adequats i compatibles amb la barreja objecte d'estudi.

En totes les modalitats d'HPLC els analits de la mostra són separats quan viatgen per la fase estacionària essent impulsats per una fase mòbil líquida. Els analits es separen degut a les diferents retencions que pateixen en interactuar amb la fase estacionària de la columna. En sortir de la columna, els components de la mostra passen a través d'un detector que registra el senyal obtingut en funció del temps de retenció. El resultat de l'anàlisi és un gràfic anomenat cromatograma que permet identificar i quantificar simultàniament els analits de la mostra. Cada pic del cromatograma representa un component i té un temps de retenció característic que ens indica l'analit present (caràcter qualitatiu). L'àrea de cada pic és proporcional a la concentració de l'analit (caràcter quantitatiu).

Actualment la **CI és la millor tècnica per a l'anàlisi d'anions**. Es basa en l'ús de resines d'intercanvi iònic com a fase estacionària. Separa les molècules en funció de les diferències en la seva càrrega superficial neta. La base per a la separació d'ions en la cromatografia iònica resideix en les diferències en els equilibris d'intercanvi entre els diversos ions de la mostra i els ions de l'eluent (o fase mòbil) amb la fase estacionària (79,89). La cromatografia iònica va ser iniciada per Small l'any 1975 (88) i des de llavors ha estat àmpliament aplicada en l'anàlisi de ions, tant inorgànics com orgànics. Es tracta d'una tècnica que presenta molts camps d'aplicació (2,82,88,90).

3.2. Columnes cromatogràfiques en CI

Les fases estacionàries emprades en CI són intercanviadors d'ions. Un intercanviador d'ions està compost per tres elements importants:

- Una matriu sòlida insoluble (que pot ser orgànica o inorgànica), normalment polimèrica, sobre quina superfície es fixen grups actius iònics. Pràcticament el 90% de les resines d'intercanvi es basen en matrius de poliestirè (Fig. 5).

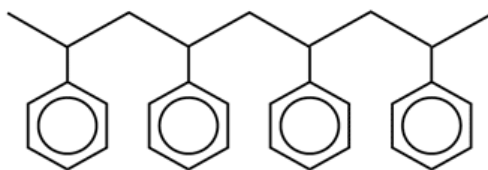


Fig. 5. Matriu de poliestirè. Font :http://dardel.info/IX/IX_Intro.html

- Llocs iònics fixos, ja sigui units o integrats en la matriu.
- I, associats amb aquests llocs fixos, una quantitat equivalent de ions de càrrega oposada a la dels ions fixos.

Els llocs iònics fixos s'anomenen grups funcionals i els ions associats de càrrega contrària són els contraions.

Els contraions són intercanviables per altres ions quan es posen en contacte amb una solució que en té, i és per aquesta propietat que aquests materials s'anomenen intercanviadors d'ions. La Fig. 6 mostra un exemple d'intercanviador d'anions.

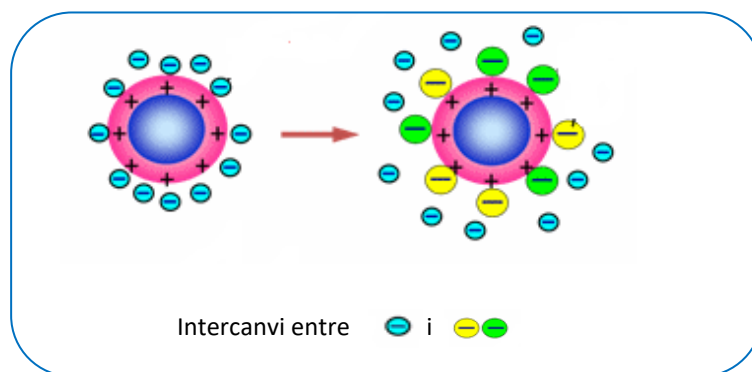


Fig. 6. Intercanvi d'anions. Les càrregues positives representen els grups funcionals (llocs iònics fixos)

A més de la propietat fonamental d'intercanvi, els intercanviadors d'ions en cromatografia iònica han de tenir les següents característiques: capacitat d'intercanviar ions ràpidament, bona estabilitat química a un ampli rang de pH, bona resistència mecànica, bon comportament front els xocs osmòtics i resistència a la deformació perquè han d'estar embalats en una columna i sotmesos al flux de la fase mòbil (79,89). Les fases estacionàries que s'utilitzen com a intercanviadors són generalment resines orgàniques modificades amb la incorporació de diferents grups per obtenir resines d'intercanvi catiònic o d'intercanvi aniònic (Taula 7).

Els intercanviador aniònics contenen grups amb càrrega positiva units covalentment a la fase estacionària i s'utilitzen per determinar anions. Es parla en aquest cas de cromatografia aniònica (Fig. 7). En la cromatografia aniònica la competició entre els anions de la fase mòbil i els de l'analit pels llocs fixos de la matriu amb càrrega positiva és el que determina el resultat cromatogràfic. En el cas d'intercanviadors catiònics, els grups que presenta la resina tenen càrrega negativa i per això són adequats per a la separació de cations (91). Es parla en aquest darrer cas de cromatografia catiònica.

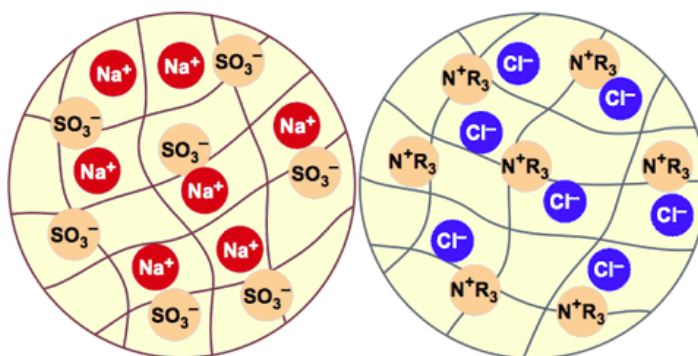
Canviador	Grup funcional	Grup intercanviat
Catiònic	Anió	Catió
Aniònic	Catió	Anió

Taula 7. Classificació general dels intercanviadors iònics

Els intercanviadors iònics es classifiquen generalment en forts o febles. Les resines intercanviadores fortes contenen grups àcids o bàsics que estan completament ionitzats a un ampli interval de pH i per tant, no perden la seva capacitat d'intercanvi. En les resines febles, la capacitat intercanviadora depèn del pH, ja que estan parcialment ionitzades. L'elecció del tipus d'intercanviador està basada en l'efecte del pH sobre la càrrega i l'estabilitat de l'analit (92). Els principals intercanviadors que s'utilitzen en CI són:

- La Fig. 7 mostra esquemàticament dos exemples de resines d'intercanvi iònic (93).

b)



Font : http://dardel.info/IX/IX_Intro.html

41

3.3. Principals detectors en CI : conductimètric i UV

Els principals detectors emprats en cromatografia iònica són el conductimètric i l'espectrofotomètric ultraviolat-visible (UV-VIS) (94).

El **conductimètric** només té aplicació en el camp de la cromatografia iònica (tots els ions tenen la característica de ser conductors) (95). Detecta canvis de conductivitat de la fase mòbil quan elueixen els analits. Tot i que és universal per als ions, presenta limitacions en quant a sensibilitat.

Es pot utilitzar una columna supressora en els casos en què la resposta originada pels ions de la fase mòbil supera de forma amplia a una baixa senyal de traces de l'analit. La supressió de ions és una tècnica habitual quan es treballa amb aquest detector: la gran quantitat d'ions que surten de la columna dificulta distingir entre la conductivitat de la fase mòbil i la de l'analit. Per solucionar aquest problema es col·loca una segona columna, anomenada columna supressora, amb una resina de càrrega oposada (per exemple, després d'una catiònica, una supressora aniònica). Així es suprimeixen els ions no desitjats de la fase mòbil: es converteixen en espècies moleculars de baixa conductivitat i d'aquesta manera es desemmascara el senyal de l'analit (79,91,96,97).

El detector **UV-VIS** és el més popular de tots els detectors d'HPLC (94). De fet, quan un equip cromatogràfic incorpora més d'un detector, sempre un d'ells és el d'absorció UV-VIS (98) perquè té aplicacions en moltes variants de la cromatografia líquida. Aquest sistema de detecció requereix que els analits absorbeixin la radiació UV-VIS, és a dir, que presentin algun grup cromòfor per a ser determinats directament. Cal utilitzar una fase mòbil no absorbent i així quan elueix l'analit es produeix un increment d'absorbància que es manifesta en forma de pic en el cromatograma.

El detector UV-VIS permet identificar analits per comparació d'espectres d'absorció. D'aquesta manera, la coincidència dels espectres d'absorció i dels temps de retenció amb els d'un patró conegut reforça la identificació del compost. És un sistema de detecció adequat per comprovar la selectivitat d'un mètode cromatogràfic (veure apartat 4.3.1).

Els detectors UV estan disponibles en una sola longitud d'ona, múltiples longituds d'ona o en configuració de díode array.

El detector que s'utilitza **en aquest treball** és un detector d'escombrat de díodes, conegut com a **PDA (detector de fotodíodes array)**. És capaç de proporcionar informació tridimensional, és a dir, valors d'absorbància, longitud d'ona i temps. Permet la mesura simultània a totes les longituds d'ona, i proporciona espectres complets a cada longitud d'ona. Aquest fet permet detectar a cada analit a la longitud d'ona òptima perquè es poden seleccionar, en cada cas, les condicions més adequades per a la detecció (99). També presenta la capacitat d'analitzar la puresa de pics i de realitzar cerques en biblioteques d'espectres UV.

Els compostos no absorbents o que donen baixa resposta en l'ultraviolat no poden detectar-se directament per detecció fotomètrica. Per determinar aquests compostos amb el detector UV la literatura indica dues **possibilitats: la derivatització i la detecció indirecta** (100).

La derivatització consisteix en incorporar, mitjançant reacció química, un grup cromòfor a l'analit no absorbent. Pot realitzar-se abans o després de la separació en la columna, però sempre prèviament a la detecció. Shen i altres indiquen que el mètode de derivatització presenta problemes i recomanen l'alternativa de detecció indirecta perquè tècnicament és més simple (100). En el següent apartat es defineix la detecció ultraviolada indirecta, que és el sistema que s'emprarà en aquest treball en el cas d'anions no absorbents (clorurs i sulfats).

3.4. La detecció ultraviolada indirecta

La detecció espectrofotomètrica indirecta està indicada per a ions que no absorbeixen en el rang UV-VIS. Consisteix en utilitzar eluents que tinguin una absorció intensa i constant en l'ultraviolat. Aquests eluents altament absorbents poden ser de benzoats o ftalats. Aleshores, en el procés cromatogràfic, quan arriba al detector un ió analít no absorbent es produeix una disminució de la absorbència de fons perquè l'analít que surt substitueix a una quantitat equivalent de l'ió absorbent de l'eluent (sempre que, lògicament, la càrrega dels ions eluent i analít sigui la mateixa). Aquest fet queda reflectit en el cromatograma en forma de depressió (pic negatiu), tal com s'aprecia en la Fig. 16 de l'apartat 5.4.4. L'ús de la detecció indirecta amb el detector UV presenta l'avantatge de poder utilitzar la mateixa instrumentació que per a la detecció directa i tan sols requereix la modificació de la fase mòbil (72,79,89,96).

3.5. Principals factors que afecten la separació en CI

L'objectiu a aconseguir en la separació cromatogràfica de components d'una barreja és l'adequada resolució entre pics amb la major puresa i en el menor temps possible. (A la Fig. 26 de l'apartat 5.4.6 s'indica la fórmula per calcular la resolució entre pics).

La retenció dels soluts en CI està determinada per la naturalesa de la mostra, el tipus i la concentració d'altres ions presents en la fase mòbil, la temperatura, el pH i la presència de solvents. Degut a la intervenció de moltes variables, sovint no és fàcil predir la separació dels ions en modificar les condicions experimentals (5). A continuació es resumeixen els principals factors que afecten la separació cromatogràfica en CI:

-Temperatura. Es un paràmetre que afecta la viscositat, i per tant, és un factor a estudiar en qualsevol tipus de cromatografia líquida. Variacions de viscositat de la fase mòbil poden modificar l'eficiència cromatogràfica. L'augment de temperatura disminueix la viscositat, reduint-se així la pressió requerida o permetent major cabal. Una baixa viscositat també fa que l'eluent flueixi més fàcilment. En augmentar la temperatura també es redueixen els temps de retenció i millora la resolució perquè augmenta la velocitat de difusió del solut. Malgrat això, altes temperatures poden degradar la fase

estacionaria i reduir la vida de la columna. Si no es controla la temperatura de la columna, aquesta pot fluctuar en funció de la temperatura ambient. La forma més simple d'eliminar els problemes derivats dels canvis de temperatura és assegurar un control termostàtic de la columna (101). Si es regula a uns pocs graus per sobre de la temperatura ambient, es millora la reproductibilitat en el temps de retenció i la precisió en anàlisi quantitatiu (5,95).

-pH de la fase mòbil.

Actualment, la majoria dels intercanviadors emprats en CI contenen resines amb grups àcid o base forts, els quals romanen totalment ionitzats en un ampli rang de pH. Per tant, el canvi de pH no afecta aquest intercanviadors (89). El pH sí que afecta els ions dels analits i de l'eluent: variacions de pH poden modificar la càrrega dels ions i la seva hidrofobicitat. Canvis de pH desplacen equilibris químics i modifiquen la càrrega de les espècies a analitzar. El pH de la fase mòbil condiciona el grau d'ionització dels analits amb propietats àcid/base, i en funció d'aquesta ionització es produeixen variacions significatives en la retenció cromatogràfica que poden afectar notablement el temps de retenció i la selectivitat. En canviar una espècie química de càrrega, varia la seva polaritat, i per tant, el seu comportament front la fase mòbil i l'estacionària.

-Característiques de l'ió analit:

En general, els intercanviadors iònics afavoreixen l'enllaç de ions de càrrega alta, menor radi hidratat i major polaritzabilitat. Per ions de la mateixa càrrega, tindran menor temps de retenció els de menor tamany (5,79,89).

El concepte de poder polaritzant està lligat amb l'acidesa o basicitat d'un ió, és a dir, amb la capacitat d'atreure o oferir electrons al contraió. En el cas dels cations, seran més àcids quant major sigui la càrrega i menor el radi iònic. És el que s'anomena poder polaritzant. Pel que fa als anions, s'entén per polaritzabilitat la seva basicitat de Lewis, és a dir, la capacitat per compartir electrons. A major quantitat de càrrega negativa i major radi iònic, els electrons de la última capa seran més susceptibles de ser atrets per cations i formaran unions més fortes.

3.6. Passos en una separació per CI (98)

El procés cromatogràfic d'intercanvi iònic HPLC consta de 4 etapes diferenciades:

1) Equilibrat inicial. El primer pas és l'equilibri de la fase estacionària a les condicions de partida desitjades. Es deixa que circuli la fase mòbil durant el temps necessari per aconseguir que la composició de l'eluent introduït a la columna sigui idèntica a la composició del mateix a la sortida d'ella.

2) Pas dels analits per la columna i elució. Un cop equilibrada la columna, s'injecta la mostra. Aquesta ha d'estar en un mitjà que permeti que els analits estiguin carregats. La fase mòbil impulsa la mostra i els analits, i, en funció de la seva càrrega, els ions elueixen a diferents velocitats a través de la columna i s'aconsegueix la separació. Cal seleccionar adequadament les condicions cromatogràfiques per aconseguir la separació eficient.

3) Equilibrat o rentat. Un cop eluïts els analits, si s'ha de fer una segona injecció, es realitza un nou equilibrat per tenir la fase estacionària preparada. La durada de l'equilibrat entre injeccions és molt menor que el temps d'equilibrat inicial. Després de la darrera injecció realitzada, cal un rentat final de la columna per eliminar qualsevol molècula encara unida.

4) Regeneració. Després de molts cromatogrames, les resines d'intercanvi iònic perden resolució i reproductibilitat. Aquest fet és degut a que normalment els processos d'elució no són capaços d'alliberar totalment tots els centres actius de la resina dels ions que té units. Per tant, cal un tractament enèrgic que netegi els ions retinguts i retorni la fase estacionària al seu estat original. Aquest tractament s'anomena regeneració. S'aplica només quan és necessari, i seguint les instruccions del fabricant de la columna.

A tall d'exemple, a la Taula 61 es poden consultar els temps d'equilibrat i rentat emprats en la programació de seqüències cromatogràfiques per a la determinació de crom hexavalent en pells. Tanmateix, l'Annex 5 detalla el procés de regeneració de la columna utilitzada en aquest treball.

3.7. Antecedents en la determinació d'anions per CI i detecció UV

Com ja s'ha vist en el Capítol 2, no existeix metodologia oficial per a l'anàlisi d'anions per CI en el sector adober. Aquest apartat s'orienta cap a la cerca bibliogràfica sobre determinació d'anions per CI i detecció UV, que és la tècnica en què es centra la tesi. La CI permet utilitzar un cromatògraf de líquids convencional, simplement cal emprar una columna específica per analitzar anions. El cromatògraf de líquids amb el detector UV està disponible en els laboratoris d'anàlisi del sector adober. Forma part de l'equipament bàsic perquè existeixen metodiques oficials vigents amb cromatografia líquida (anàlisi de formaldehid i de fungicides, com el TCMTB) (7-9). Així, s'optimitzaran al màxim els recursos existents en un laboratori del sector de la pell.

Aquest apartat aprofundeix en les condicions cromatogràfiques emprades per diferents autors en diversos sectors. Interessa conèixer, sobretot, les fases mòbils de la literatura per tal que puguin servir com a punt de partida en aquesta investigació.

Dins de la detecció UV en CI també es considera la vessant de detecció indirecta, aplicable a anions no cromòfors. És una alternativa molt adequada per als analits transparents en l'UV, com s'ha explicat als apartats 3.3 i 3.4.

La recerca es presenta diferenciada en tres àmbits:

- Determinació simultània d'anions absorbents amb detecció UV directa.
- Determinació simultània d'anions absorbents i no absorbents amb detecció UV indirecta.
- Determinació de crom hexavalent amb detecció UV directa.

3.7.1. Antecedents en la determinació simultània d'anions per cromatografia iònica i detecció UV directa

Hi ha publicada una norma sobre determinació d'anions inorgànics en aigües potables, subterrànies, superficials, residuals, lixiviats i aigües marines per cromatografia líquida iònica, la UNE-EN ISO 1034, dividida en tres parts i ja citada a l'apartat 2.4. La Part 1 d'aquesta norma, la UNE-EN ISO 1034-1:2009 (95), és la que es troba més relacionada amb els anions d'interès que incrementen la salinitat en el sector adober. Aquesta norma no contempla l'anàlisi d'anions orgànics, i indica que els àcids orgànics alifàtics poden interferir en la separació d'anions. La norma es refereix preferentment al detector conductimètric (CD) i comenta que es pot utilitzar el detector UV per bromur, nitrat o nitrit si es requereix una major sensibilitat i/o en cas d'interferències de matriu en el detector CD. En cas de treballar amb la detecció directa, el bromur, nitrat i nitrit poden mesurar-se a longituds d'ona compreses entre 200 i 215 nm. També explica que la selecció de l'eluent depèn del tipus de columna i del detector utilitzat. Com a exemple de fase mòbil a emprar amb la detecció conductimètrica amb columna supressora, cita la composada per 0,0027 M en carbonat de sodi i 0,001 M en hidrogen carbonat sòdic. La norma no proposa cap altra condició cromatogràfica; proporciona bàsicament criteris de qualitat sobre els requisits de la columna separativa i dels reactius per al calibratge. A títol informatiu presenta dades de precisió d'assajos d'intercomparació realitzats en alguns països europeus.

Existeix una publicació de Waters (102) que indica com a típiques fases mòbils en Cl els següents eluents: borat/gluconat, carbonat/bicarbonat, àcid nítric i hidròxid de liti. Segons aquest document, l'eluent borat/gluconat és adequat pels detectors UV i CD. També presenta la fase carbonat/bicarbonat com adequada per a la detecció CD amb supressió, perquè d'aquesta manera la columna supressora pot disminuir la conductivitat de l'eluent i així incrementar la conductivitat resposta dels analits.

3.7.2. Antecedents en la determinació simultània d'anions per cromatografia iònica i detecció UV indirecta

La detecció fotomètrica indirecta en cromatografia iònica va ser desenvolupada per Small i Miller i és reconeguda com a un mètode simple i sensible per a la determinació simultània d'anions provinents d'àcids forts o febles. Aquesta tècnica emprava un eluent altament absorbent en l'UV. Es basa en el desplaçament dels ions absorbents de la fase mòbil per part de l'analit, fet que origina una depressió de la senyal de fons, com s'ha explicat a la secció 3.4 (79,89,90,98,103-107).

Des dels inicis d'aquest sistema de detecció, diferents autors l'han emprat per analitzar ions en diverses mostres, però no existeix cap estudi aplicat al sector adober. En curts hi ha antecedents d'aquest sistema de detecció però amb la tècnica d'electroforesi capil·lar (25).

Hayakawa i Yamamoto van recollir en una revisió al 1995 alguns exemples d'aplicació de la detecció indirecta fotomètrica en HPLC (108).

Lazar i els seus col·laboradors publiquen l'any 1999 un mètode per a la determinació d'anions inorgànics en aigües naturals i emprant com a fase mòbil àcid o-ftàlic TRIS/acetoni (109). Els autors defensen la detecció UV indirecta indicant que es tracta d'un sistema econòmic i molt versàtil.

L'any 2007 es publica una interessant revisió sobre detecció indirecta fotomètrica (100). Aquest article ha estat de gran utilitat com a punt de partida en l'experimentació amb detecció indirecta. La Taula 8 recull un resum de les principals fases mòbils descrites en aquesta revisió quan s'empra detecció UV indirecta per a la determinació d'anions inorgànics en mostres reals de diferents sectors mitjançant cromatografia iònica.

Analit i mostra	Fase mòbil	Columna	Longitud d'ona (nm)	Ref.
Acetat, clorur (drogues, ertapenem sòdic)	1,0 mM àcid p-hidroxibenzoic (pH 9,5)/metanol=99/1(v/v)	PRP-X100	305	(77)
Sulfat (drogues)	5,8 mM àcid p-hidroxibenzoic i 2,5%metanol (pH 9,4)	PRP-X100	310	(110)
Sulfits (aliments)	0,15 g/L hidrogenftalat de potassi (pH 5,7)	Supelcosil LC-SAX	280	(111)
Bromurs (sang)	0,01 M citrat tampó acetonitril 80:20 (v/v) que contingui 0,1 mM perclorat de papaveraldin i 2,6-4,5mM hidròxid de tetrabutilamoni	µBondapak C18		(112)
Clorur, bromur i nitrat	1mM iodur sòdic i 0,3 mM àcid tartàric (pH 3,3)	Octadecylsilica inmobilitzada amb serum boví	225	(113)
Clorur, nitrat i sulfat (sèrum, aigües potables)	2mM àcid 3-nitroftalic (pH 4,0) i 18% acetonitril	Hypersil-5-ODS recobert amb bromur detiltrimetilamoni	325	(114)
Clorur, cianat, sulfat , tiosulfat i tiocianat (efluents de processos d'obtenció d'or)	0,5 mM àcid 1,3,5-benzettricarboxilic amb 2,5%(v/v) n-butanol	Supelcosil LC-18 recobert clorur de cetylpiridinium	254	(115) (116)
Fluorur, fosfat, clorur, bromur, iodur, sulfat (residus químics sòlids i líquids)	2mM ftalat àcid de potassi (pH 5,0)	PRP-X100	272	(117) (118)
Nitrit, nitrat, clorat, sulfat (residus d'explosius)	4mM clorur de benziltributilamoni/5mM tampó fosfat (pH 4,6)/0,25 mM hexà-sulfonat	Lichrospher RP-18	222 262	(119)
Clorur, nitrat i sulfat (aigües potables)	1 mM salicilat sòdic (pH 5,8) amb un 5% acetonitril	Develosil ODS-3K recoberta amb bromur de cetilmetilamoni	230	(120)
Sulfat (aigua intersticial)	1,6 mM àcid sulfobenzoic i 0,2 mM àcid trimesic (pH 5,5)	Nucleosil SB anion exchange	258	(121)
Nitrat (aigües potables i superficials)	1mM ftalat àcid de potassi (pH 3,95)	Partisil 10 SAX	265	(122)

Taula 8. Resum d'algunes aplicacions de la detecció fotomètrica indirecta d'anions inorgànics per HPLC recollides a la revisió de Shen (100)

S'han trobat altres articles que determinen anions inorgànics per detecció indirecta en cromatografia que no estan recollits a l'anterior revisió:

- Maki i Danielson treballen amb la fase mòbil naftalensulfonat (123) i realitzen un estudi comparatiu entre la detecció conductimètrica i la fotomètrica indirecta. Amb la fase mòbil naftalensulfonat aconseguixen millors límits de detecció amb el detector CD. Aquests autors indiquen que la sensibilitat analítica no depèn només del sistema de detecció, sinó que el tipus d'eluent també intervé. Proporcionen referències que demostren que la detecció fotomètrica indirecta amb fase mòbil ftalat és molt més sensible que la conductimètrica (124-126). Segons Cochrane (124), la fase mòbil ftalat amb detecció fotomètrica indirecta proporciona límits de detecció unes 10 vegades superiors a la detecció conductimètrica.
- Muenther i altres (127) separen simultàniament ions inorgànics i orgànics neutres utilitzant el detector conductimètric i l'ultraviolat en sèrie. Empren en la detecció ultraviolada indirecta la fase mòbil 2mM en ftalat àcid de potassi.

Per tot l'exposat anteriorment, es considera necessari avançar en el desenvolupament de nous mètodes analítics cromatogràfics en el sector adober que permetin l'anàlisi d'anions de manera ràpida, eficaç i aprofitant al màxim els recursos d'un laboratori de curtits. El fet que la literatura presenti la detecció ultraviolada indirecta com a tècnica simple i com a millor alternativa al detector conductimètric en cromatografia iònica, ha motivat l'aplicació d'aquest sistema de detecció.

3.7.3. Antecedents en la determinació de crom hexavalent per CI i detecció UV directa

A l'apartat 2.5 ja s'ha explicat l'interès del crom hexavalent en el sector adober. El Cr(VI) és inestable com a catió i s'extreu de la pell i es determina com a anió cromat. S'exposen les referències trobades relatives a la determinació de crom hexavalent mitjançant CI en mostres de diferents sectors.

La norma ISO 10304-3:1997 (128), referida a la Qualitat de l'aigua, proposa dos eluents diferents per a la determinació de cromat per CI i detecció UV:

-Solució 0,001 M d'àcid piridin-2,6-dicarboxílic, 0,001 M d'hidrogenfosfat de disodi, 0,005 M iodur sòdic, 0,025 M acetat de sodi, 0,0014 M d'hidròxid de liti i aproximadament 5% d'acetona.

-Solució 0,25 M sulfat amònic i 0,1 M hidròxid amònic.

L'any 2003 Jeevan R. i altres van determinar crom hexavalent en mostres de cuir emprant un eluent també 25 mM amoni-sulfat amònic. La detecció era a 540 nm després d'una derivatització post-columna amb difenilcarbàcida (83).

La casa comercial Metrohm recomana, en un document de l'any 2008, l'eluent 4,0 mM/L en hidrogencarbonat de sodi i 12,8 mM en carbonat sòdic per a determinar cromat en pells curtidors i emprant derivatització post-columna amb DFC (84).

Peterson J. i altres van aplicar la tècnica ASE-IC (extracció accelerada amb solvent en combinació amb la cromatografia iònica) per extreure i determinar Cr (VI) en guants de pell amb posterior derivatització post-columna amb DFC. La concentració de la fase mòbil era 250 mM en sulfat amònic i 100 mM en hidròxid amònic (85).

Yu R. i els seus col·laboradors van publicar al 2012 un article on també empraven la tècnica ASE-IC per extreure i determinar simultàniament Cr (III) i Cr(VI) en mostres de plàstics. L'eluent emprat contenia 2 mmol/L PDCA (àcid 2,6-piridincarboxílic), 2 mmol/L iodur potàssic, 100 mmol/L acetat amònic i 2,8 mmol/L hidròxid de liti (129). Els ions de crom hexavalent i trivalent es derivatitzaven amb difenilcarbàcida i àcid 2,6-piridincarboxílic, respectivament, i es detectaven en el rang de l'UV-VIS. L'any 2014 Che Jinshui i altres, apliquen la mateixa metodologia a altres materials, entre ells el cuir [86].

L'empresa Waters, en resposta a la consulta que se li va realitzar via correu electrònic, va indicar que l'anàlisi de cromat amb detecció UV s'acostuma a realitzar amb l'eluent Borat/Gluconat.

D'altra banda, es coneix per comunicació privada que el centre de recerca alemany PFI (Prüf- und Forschungsinstitut) havia determinat Cr(VI) en algunes mostres de pell per CI i detecció UV a 372 nm amb un eluent 0,25 M en sulfat amònic i 0,01 M en hidròxid sòdic, la mateixa fase que la recomanada per la norma d'aigües ISO 10304-3:1997 (128).

La Taula 9 resumeix els eluents proposats pels diferents autors amb els corresponents temps de retenció per l'anió cromat.

Mostra	Tècnica cromatogràfica per a la determinació de l'anió cromat	Fase mòbil	Temps de retenció (min)	Ref.
Guants de pell	ASE-IC amb derivatització post columna amb DFC detecció a	250 mM en sulfat amònic i 100 mM en hidròxid amònic.	3,2	(85)
Aigües	IC amb detecció UV	250 mM sulfat amònic i 100mM hidròxid amònic	No indicat	(128)
Aigües	IC amb detecció UV	0,001 M d'àcid piridin-2,6-dicarboxílic, 0,001 M d'hidrogenfosfat de disodi, 0,005 M iodur sòdic, 0,025 M acetat de sodi, 0,0014 M d'hidròxid de liti i aproximadament 5% d'acetona	No indicat	(128)
Pells	IC amb derivatització post-columna amb DFC	4,0 mM/L en hidrogencarbonat de sodi i 12,8 mM en carbonat sòdic	8,1	(84)
Pells	IC amb derivatització post-columna amb DFC	25 mM sulfat amònic	6,5	(83)
Plàstics, pells	ASE-IC	2 mmol/L PDCA (àcid 2,6-piridincarboxílic), 2 mmol/L iodur potàssic, 100 mmol/L acetat amònic i 2,8 mmol/L hidròxid de liti	9	(129)

Taula 9. Principals eluents per determinar cromat per CI en diferents mostres



Capítol 4. Validació de mètodes analítics

4.1. Concepte de validació

Les etapes bàsiques per desenvolupar un mètode analític són:

- Recerca bibliogràfica.
- Definició de les condicions inicials (l'equip, els reactius, el mostreig...).
- Estandardització del mètode (trobar les millors condicions).
- Validació.

La **validació** és el procediment que permet establir si un mètode és adequat per a la finalitat que ha estat proposat. Consisteix en confirmar i documentar que els resultats obtinguts de l'aplicació d'un mètode d'anàlisi són confiables i reproduïbles (130).

El procés de validació és una part integral del desenvolupament d'un mètode analític i és una exigència de la Reglamentació de Bones Pràctiques de Laboratori (BPL). D'acord a la política de qualitat, els laboratoris d'anàlisi han de treballar amb l'objectiu de generar i garantir resultats confiables. Des del punt de vista comercial, els mètodes validats permeten obtenir dades fiables que facilitin les transaccions comercials basades en l'acceptació mútua dels resultats (131).

Els mètodes analítics han de ser validats o revalidats en diferents casos (132,133):

- Quan no estan normalitzats.
- Quan es desenvolupa un nou mètode.
- Quan es revisa un mètode estandaritzat per millorar-lo o estendre-ho a una mostra o analit diferents per als que ha estat establert.
- Quan el control de qualitat indica que el mètode en us està canviant amb el temps.
- Per demostrar l'equivalència entre dos mètodes, per exemple, un mètode nou i una norma.

La validació de mètodes ha rebut una atenció considerable en la literatura i per part de les agències reguladores i de les comissions d'indústria, alguns exemples són:

- La ISO/IEC 17025 inclou un capítol sobre la validació de mètodes (134).
- Manuals i guies relatius al desenvolupament i validació de mètodes d'anàlisi publicats per diferents organismes tals com IUPAC, EURACHEM, AEFI, OMS, Còdex Alimentarius (130,133,135-137).
- Requisits establerts per les farmacopees sobre la validació de mètodes, per exemple la USP (Farmacopea dels Estats Units d'Amèrica) i la EP (Farmacopea europea).

4.2. Estratègies de validació de mètodes

Existeixen dues formes bàsiques per validar un mètode analític (133), la **validació interna** (estudi intralaboratori) i la **validació externa** (estudis col·laboratius interlaboratoris). Aquesta tesi ha utilitzat ambdós sistemes de validació en els mètodes desenvolupats:

- Determinació d'anions en pell: validació interna (apartat 6.7).
- Determinació de nitrats, clorurs i sulfats en aigües residuals: validació externa (apartat 7.5).
- Determinació de crom hexavalent en pell: validació interna i externa (apartats 8.9 i 8.10).

4.2.1. Estudi intralaboratori (validació interna)

És un estudi realitzat per un únic laboratori. La validació del mètode es pot realitzar a través de la determinació dels paràmetres de validació definits a l'apartat 4.3 o bé comparant el mètode a validar amb un altre mètode acceptat (oficial, normalitzat o validat). La validació interna informa de tots els paràmetres del mètode, menys de la reproductibilitat (variació entre laboratoris).

4.2.2. Estudi en col·laboració amb altres laboratoris (validació externa)

Aquesta eina de validació es basa en la realització d'una sèrie de mesures sobre un o varis analits per part d'un cert nombre de laboratoris, de forma independent, amb l'objectiu de comparar estadísticament els resultats. La validació externa sí que permet valorar la reproductibilitat. Quan es desenvolupa un mètode amb elevades perspectives d'ús, com és el cas d'un procediment normalitzat publicat, la manera preferida de portar a terme la validació és mitjançant un estudi de col·laboració que involucri un grup de laboratoris. Un mètode publicat validat per aquesta via també proporciona gran robustesa (133,138).

Els estudis col·laboratius formen part d'un conjunt d'assajos anomenats **assajos interlaboratoris** o exercicis o programes d'intercomparació. Els programes d'intercomparació poden classificar-se en tres tipus, segons l'objectiu que es proposin (Fig. 8) (137,139,140).

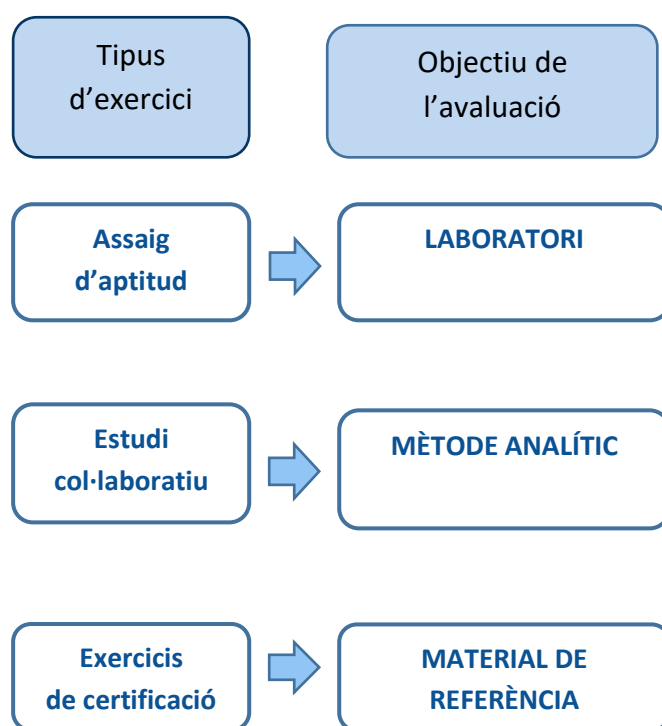


Fig. 8. Tipus d'exercicis d'intercomparació o assajos interlaboratoris

En el marc de la garantia de qualitat dels laboratoris, els assajos interlaboratoris són una important eina d'avaluació externa. Es defineixen com la sèrie de mesures

realitzades sobre un o varis analits i desenvolupades independentment per un cert nombre de laboratoris en un material donat.

Els laboratoris que participen en els aquests exercicis accepten realitzar un mateix treball analític, sota la coordinació d'una organització, amb l'objectiu d'avaluar la qualitat del seu treball, validar un mètode o bé determinar el contingut d'un element o d'un compost en un material (140).

Hi ha una sèrie de normes i protocols que han de considerar els organitzadors d'aquests assajos, com ara:

- La Norma UNE-EN ISO/IEC 17043:2010 *“Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los ensayos de aptitud”*.
- La Norma ISO 13528:2015 *“Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison”*
- El protocol IUPAC Technical Report *“The International harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories”* (141).

En aquesta tesi s'ha participat en assajos d'aptitud i en estudis col·laboratius, com s'ha indicat en el punt 4.2. Hi ha diferències entre aquests dos tipus d'estudi:

a) En els assajos d'aptitud s'avalua el laboratori en tots els seus aspectes, tant humans com materials, i s'anima als laboratoris a participar utilitzant el seu mètode d'anàlisi habitual per simular, al màxim possible, l'anàlisi rutinari de la mostra rebuda. Encara que el resultat de l'anàlisi pot dependre del mètode seleccionat, també pot estar afectat pel rendiment dels equips del laboratori o la competència de l'analista (139). El mètode desenvolupat en aquesta tesi per a la determinació d'anions amb Cl i detecció UV indirecta ha participat amb èxit en diversos estudis d'aptitud aplicats a l'anàlisi de mostres d'aigües residuals (apartat 7.5).

b) En els estudis col·laboratius s'avalua el mètode d'anàlisi. Aquests estudis permeten establir l'efectivitat i el grau de comparació de nous mètodes i fer el

seguiment dels mètodes establerts. Avaluen la capacitat d'un mètode a l'hora de proporcionar resultats reproduïbles entre laboratoris.

En definitiva, els estudis col·laboratius constitueixen un mecanisme d'avaluació de la qualitat dels resultats analítics i representen una font d'informació útil en la validació de mètodes. Com s'ha comentat anteriorment, un dels criteris per a la selecció d'un mètode analític és donar preferència a mètodes que hagin establert la seva qualitat i confiança mitjançant estudis col·laboratius interlaboratoris (138).

Un estudi col·laboratiu s'ha de planificar utilitzant un mètode que hagi estat seleccionat per una organització amb una finalitat determinada (per exemple: la AOAC, la ISO...) o bé emprant un mètode que es conegui a fons perquè hagi estat suficientment assajat. En aquest darrer cas, convé disposar d'un laboratori experimentat que estudiï prèviament les característiques del mètode.

Un cop establert el mètode per part de l'organització, tots els laboratoris participants l'han de seguir i analitzen les mostres segons les instruccions que figuren en el protocol proporcionat pels organitzadors. Cal lliurar els resultats dins el termini establert.

El mètode cromatogràfic desenvolupat en aquesta tesi per a la determinació de crom hexavalent en pell, considerant que estava destinat a convertir-se en futura norma oficial ISO, ha participat en assajos d'aquests tipus (apartat 8.10 i Annex 7), tot i que també ha estat sotmès a una validació interna (apartat 8.9).

En ambdós tipus d'assaigs, un cop finalitzat el procés, l'entitat organitzadora emet un **informe** que **avalua la qualitat dels resultats** a través d'un tractament estadístic que proporciona dades d'incertesa, precisió i competència del laboratori.

Un dels criteris emprats per a l'avaluació dels resultats és la **puntuació Z-score**, que es calcula a partir de la fórmula: $Z=(x-m)/s$, on x és el valor de la mitjana aritmètica obtingut pel laboratori participant, m és el valor assignat i s és la desviació estàndard del conjunt (139). Aquest paràmetre expressa la diferència entre el resultat de cada laboratori i el valor assignat (mitjana aritmètica dels participants) amb relació a la desviació del grup, i valora el grau de compliment dels laboratoris participants.

La interpretació de la puntuació Z-score és la següent:

El resultat és satisfactori si $|z| < 2$,

El resultat del laboratori és qüestionable si $2 < |z| < 3$

El resultat del laboratori és Insatisfactori si $|z| > 3$

4.3. Paràmetres de validació de mètodes

Diferents organismes, ja citats a l'apartat 4.1, han establert els paràmetres a considerar en la validació de mètodes.

Les validacions internes realitzades en aquesta tesi han estudiat els paràmetres fonamentals recomanats per l'*Asociación Española de Farmaceuticos de Industria (A.E.F.I.)* (130): selectivitat, linealitat i rang, precisió (repetibilitat i precisió intermèdia), exactitud i límit de detecció.

La A.E.F.I. indica que no en tots els casos s'ha de determinar el límit de detecció i especifica que quan es valori la reproductibilitat no caldrà determinar la precisió intermèdia.

En la validació de mètodes es comprova si els paràmetres de validació determinats compleixen els **criteris d'acceptació** establerts prèviament. Aquests criteris es fixen a priori per a cada un dels paràmetres en base a la finalitat del mètode i a la informació recollida durant la fase de desenvolupament del procediment. Tot seguit es defineixen els paràmetres de validació que s'han estudiat.

4.3.1. Selectivitat

La selectivitat es defineix com la capacitat d'un mètode per quantificar i/o identificar simultània o separadament els analits d'interès, de forma inequívoca, en presència d'altres substàncies químiques que puguin estar presents en la mostra.

La selectivitat és una condició essencial per aconseguir una bona exactitud, per la qual cosa constitueix un criteri clau en la validació d'un mètode analític. Aquest paràmetre depèn de les característiques del propi mètode analític i de les característiques de la mostra (matriu) que s'analitza. Existeixen diverses formes per comprovar la selectivitat (142):

- Càlcul de l'índex de selectivitat.
- Anàlisi de mostres d'assaig a les que s'han afegit interferències de forma deliberada. (Han de ser interferències sospitades que puguin estar presents conjuntament amb els analits d'interès).
- Ús de tècniques confirmatòries, com la cromatografia de gasos amb detecció per espectrometria de masses (GC-MS) o la cromatografia de líquids amb detecció espectrofotomètrica UV-Visible amb un detector de fotodíodes (apartat 3.3) (143). El detector de díodes en HPLC permet avaluar la coelució d'analits en un mateix pic cromatogràfic aplicant un algoritme matemàtic que compara els espectres adquirits al llarg del pic amb la finalitat de determinar si consta d'un o més compostos amb espectres diferents. Les diferències observades entre els espectres adquirits han de ser explicables per la variabilitat deguda a l'efecte del soroll i del dissolvent.

La selectivitat d'un mètode s'ha de definir abans d'estudiar qualsevol altre paràmetre de validació perquè s'ha de conèixer en quin grau la resposta del mètode és únicament proporcionada per l'analit, sense interferència d'altres substàncies.

D'altra banda, segons la A.E.F.I, la manca de selectivitat d'un mètode analític pot ser compensada per altres procediments. No és necessari rebutjar els mètodes analítics poc selectius, podran utilitzar-se sempre que en el mètode de control de rutina s'inclogui un procediment complementari que demostrï que les substàncies interferents estan absents, o bé que es troben en concentracions inferiors a les que puguin produir una interferència significativa en el resultat.

4.3.2. Linealitat i Rang

La linealitat d'un mètode analític és la capacitat del mètode per produir resultats que siguin directament, o mitjançant una transformació matemàtica definida, proporcionals a la concentració d'analit de la mostra dins d'un rang establert.

El rang es refereix a l'interval de concentracions d'analit dins del qual es pot considerar el mètode validat, es a dir, interval entre la concentració superior i la inferior d'analit per la qual s'ha demostrat la correcta precisió, exactitud i linealitat del mètode descrit.

En els estudis de linealitat es representa gràficament una recta de regressió que relaciona concentracions de patrons amb respostes de l'aparell i s'avalua estadísticament la linealitat. La mesura de la bondat de l'ajust pot realitzar-se de diverses formes: a partir del càlcul dels coeficients de correlació (r) i de determinació (r^2), amb la representació dels residuals, mitjançant anàlisi de variància ANOVA i emprant test de linealitat. El valor recomanat per al coeficient de correlació és $r \geq 0,999$ (130,135,144,145).

4.3.3. Límit de detecció i límit de quantificació

En termes generals, el límit de detecció (LD) es pren com la menor concentració d'un component que pot ser detectada, però no necessàriament quantificada, de forma fiable amb un mètode d'anàlisi donat (146).

En el cas de procediments analítics instrumentals que presenten soroll de fons, els documents de ICH (International Council for Harmonisation) descriuen un enfocament del càlcul del límit de detecció basat en comparar senyals mesurades a partir de mostres amb baixes concentracions d'analit amb senyals de mostres blanc.

La literatura defineix el LD d'un detector cromatogràfic com la concentració de l'analit que proporciona un senyal tres vegades superior a la del soroll de la línia de base del detector (147). Per tant, en cromatografia, el límit de detecció és la quantitat d'analit injectada que es tradueix en un pic amb una alçada al menys tres cops més alta que el nivell de soroll de la línia de base, tal i com es mostra en el pic A de la Fig. 9.

El LD es calcula aplicant la següent fórmula:

$$LD = C \cdot 3/(s/n)$$

On:

LD: límit de detecció

C: concentració de l'analit (es recomana un patró a baixa concentració)

n: soroll

s: senyal

s/n: relació senyal soroll

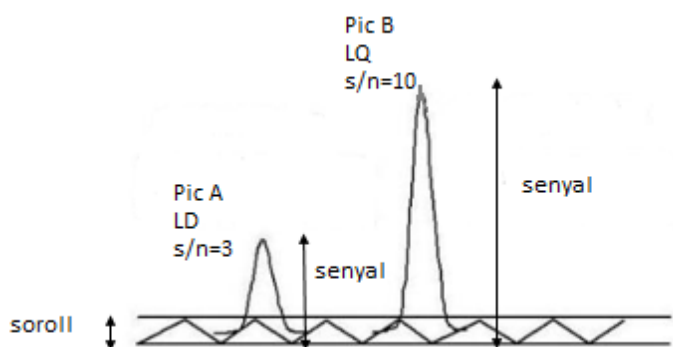


Fig. 9. Exemples de relacions s/n de 3: 1 i de 10: 1, que s'aproximen als requisits per al LD i LQ, respectivament

Per a la determinació del LD basada en el mètode relació senyal/soroll, la Farmacopea Europea defineix la **relació s/n** com:

$$s/n = 2H/h$$

On (veure també Fig. 10):

H: alçada del pic corresponent al patró (de baixa concentració) des de la línia de base.

h: amplitud màxima del soroll de fons de la línia de base causada pel blanc (fase mòbil) i observada en una distància de 20 vegades l'amplada que presenta el pic de l'analit en la meitat de la seva alçada (W), o dit d'una altra manera, amplitud màxima observada a 10 cops l'amplada del pic a ambdós costats del temps de retenció).

La Fig. 10 representa gràficament els paràmetres que intervenen en el càlcul de la ràtio s/n .

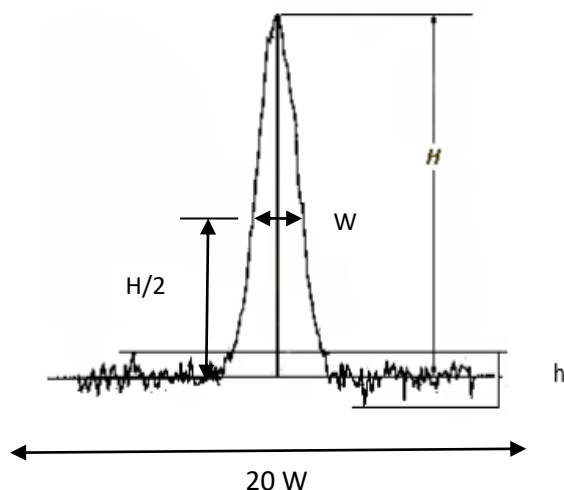


Fig. 10. Representació gràfica dels paràmetres que intervenen en el càlcul de la relació s/n

El **límit de quantificació (LQ)** és la mínima concentració o massa d'analit que es pot quantificar per a un nivell de confiança donat. El LQ és un valor de concentració superior al LD, és més "real" i no és només una fluctuació aleatòria de la lectura del blanc (148).

El límit de quantificació es considera la concentració de la solució patró a la qual la relació s/n és igual a 10 (pic B de la Fig. 9):

$$LQ = C \cdot 10 / (s/n)$$

On:

LQ: límit de quantificació

C: concentració de l'analit (es recomana un patró a baixa concentració)

n: soroll

s: senyal

s/n : relació senyal soroll (calculada de la mateixa forma que en el LOD)

Pel que fa als criteris d'acceptació d'aquests paràmetres, caldrà complir els valors indicats en la reglamentació específica. En el cas del crom hexavalent en pell, les versions revisades entre els anys 2015 i el 2016, i publicades el 2017, de les normes ISO 17075-1 i ISO 17075-2 mantenen el límit de quantificació de 3 mg/kg de la versió original de la norma. En aquest treball s'ha comprovat que la sensibilitat del mètode cromatogràfic desenvolupat compleix aquest requisit (apartat 8.9.3).

4.3.4. Precisió

La precisió és la capacitat d'un mètode per proporcionar resultats pròxims entre sí. Valora el grau de dispersió dels resultats analítics respecte al seu valor mitjà i s'expressa generalment a través de la desviació estàndard relativa o del coeficient de variació. La precisió es pot estudiar a tres nivells:

-Repetibilitat: Avalua la precisió del mètode efectuant una sèrie d'anàlisis sobre la mateixa mostra en les mateixes condicions operatives (aparells, reactius, analista) en un mateix laboratori i en un període de temps curt.

-Precisió intermèdia: Avalua la precisió del mètode enfront de variacions internes del laboratori (analista, dia, instrument...) És la precisió intralaboratori o reproductibilitat intralaboratori.

-Reproductibilitat: Avalua la precisió entre laboratoris diferents (interlaboratori).

A la literatura existeixen taules que recomanen criteris d'acceptació d'aquest paràmetre en funció de la concentració d'analit (149).

4.3.5. Exactitud

L'exactitud d'un mètode analític és el grau de concordança entre el resultat d'una mesura i el valor de referència acceptat; el problema és que normalment aquest valor és desconegut. L'avaluació de l'exactitud de mètodes es basa en algun dels següents procediments (150):

- Utilització de materials de referència certificats.
- Comparació dels resultats obtinguts amb els d'un mètode de referència alternatiu.
- Anàlisi de mostres adicionades.
- Preparació i anàlisi de mostres sintètiques.

També caldrà determinar si es compleix el criteri d'acceptació establert. En el cas de l'anàlisi de mostres adicionades, que és un dels procediments més fàcils de practicar perquè no sempre és possible disposar de mostres de referències certificades, es calcula el valor del paràmetre anomenat *recuperació*. Aquest paràmetre s'expressa com a percentatge de l'analit recuperat respecte a la concentració adicionada. Un exemple

de càlcul del percentatge de recuperació és el que es troba a l'apartat 8.2 de de la norma ISO 17075:2017 per a la determinació de crom hexavalent en pells:

$$\eta = \frac{A_s \times (V_1 + V_2) - A \times (V_1)}{A_{st} \times (V_1 + V_2)} \times 100$$

On:

η és la ràtio de recuperació expressada en percentatge (%)

V_1 és el volum de la solució mostra en la solució dopada, expressat en mL

V_2 és el volum de patró cromat en la solució dopada, expressat en mL

A_s és l'àrea del pic de cromat de la solució mostra després d'afegir crom (VI)

A és l'àrea del pic de cromat de la de la mostra original

A_{st} és l'àrea del pic de cromat en la solució d'extracció després d'afegir crom (VI)

L'AOAC proporciona valors acceptables de percentatge de recuperació en funció de la concentració d'analit en mostra. No obstant això, cal tenir present que aquests valors han d'estar modulats per la naturalesa de la matriu i la complexitat del procediment d'anàlisi, que poden limitar extraordinàriament la recuperació (130).

En aquesta línia, el Comitè Tècnic TC289 va consensuar en la secció 7.5 de la norma ISO 17075:2-2017 que la taxa de recuperació en la determinació de crom hexavalent en pell havia d'estar entre 80% i 120%.

Capítol 5. Desenvolupament de metodologia per a la determinació simultània d'anions absorbents i no absorbents (CI)

5.1. Introducció

Un dels dos blocs principals que configuren la part experimental de la tesi és el desenvolupament de metodologia cromatogràfica que permeti la separació i quantificació simultània d'anions en diferents mostres del sector adober. A l'apartat 1.1 s'ha justificat la necessitat de crear aquests nous mètodes.

Els analits que es pretenen determinar són: **fluorur, fosfat, clorur, nitrit, bromur, nitrat, sulfat i formiat.**

Al llarg del Capítol 2 s'ha detallat la procedència i la importància dels anions d'interès en les diferents etapes i mostres del procés d'adobament. La Taula 10 resumeix els principals anions que són susceptibles d'ésser analitzats per cromatografia iònica en les diferents mostres d'adoberia. Encara que els ions fluorur, bromur i nitrit no s'empren en adoberia, s'han investigat per assegurar que no interfereixen en les determinacions dels altres analits i valorar la selectivitat de la metodologia a desenvolupar. Igualment s'ha comprovat que els anions orgànics acetat i lactat no interfereixen en la determinació de formiat (apartat 5.4.9).

Mostres	Anions d'interès
Productes químics	-Quantificació d'àcids fòrmics -Determinació d'impureses (clorurs, sulfats...) en diferents productes químics
Pells	-Quantificació de: clorur, sulfat, nitrat, lactat, acetat, formiat
Aigües	-Anions característics de les adoberies i/o regulats per la legislació d'abocaments: Clorur, sulfat, nitrat, nitrit, fosfat

Taula 10. Principals anions d'adoberia susceptibles d'ésser analitzats per CI

Per tal d'optimitzar recursos en els laboratoris del sector, s'ha treballat amb un cromatògraf de líquids amb detector ultraviolat, que forma part de l'equipament estàndard d'obligada adquisició en un laboratori d'anàlisi del sector de la pell. Aquest sistema de detecció identifica anions absorbents, però no permet l'anàlisi directa dels ions no absorbents, com ara clorurs o sulfats. És per aquest motiu que també s'han investigat les possibilitats de la detecció UV indirecta en l'anàlisi d'anions no absorbents i s'han obert dues línies d'investigació, diferenciades en el sistema de detecció:

- a) *Detecció ultraviolada indirecta* (apartat 5.4): Indicada per ions que no absorbeixen en el rang UV-VIS (clorur, sulfat, fosfat, fluorur), tot i que també permet l'anàlisi d'anions absorbents. Requereix l'ús d'una fase mòbil fortament absorbent.
- b) *Detecció ultraviolada directa* (apartat 5.5): Per determinar anions absorbents (com per exemple nitrat, nitrit i bromur) i poc absorbents (formiat). En aquest cas s'ha d'utilitzar una fase mòbil no absorbent.

En els punts 3.3 i 3.4 s'han tractat els fonaments de les dues formes de detecció.

Si bé en el mercat existeixen diferents cases comercials que ofereixen diversos tipus de columnes cromatogràfiques específiques per a determinats anions, cal destacar, en l'àmbit d'optimització de recursos, que en aquest treball s'ha emprat **una mateixa columna cromatogràfica**.

La Fig. 11 esquematitza les **etapes globals** seguides en aquest bloc de la tesi.

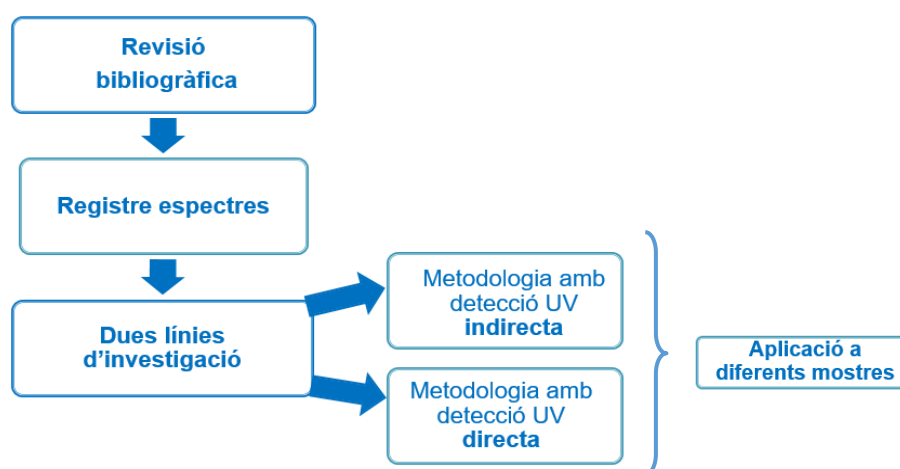


Fig. 11. Etapes de la recerca per desenvolupar metodologia HPLC aplicable a la determinació d'anions d'interès en adoberia

En primer lloc es va realitzar una **recerca bibliogràfica general**, recollida al Capítol 2 i a la secció 3.7, sobre les tècniques analítiques actuals en l'anàlisi d'anions i sobre la situació de l'anàlisi d'anions en el sector adober. La revisió de la literatura va permetre:

- Comprovar que la cromatografia iònica és actualment la tècnica més adequada per a l'anàlisi d'ions.
- Constatar que no hi ha metodologia específica cromatogràfica en el sector adober per a l'anàlisi d'anions.
- Orientar la investigació cap a la cromatografia iònica amb detecció UV directa i indirecta.
- Seleccionar les condicions cromatogràfiques inicials com a punt de partida dels estudis amb detecció indirecta i directa (apartats 5.4.2 i 5.5.2 respectivament).

A continuació es van **registrar els espectres d'absorció UV** dels diferents anions per confirmar quins d'ells absorbeixen la radiació UV (apartat 5.3). A partir d'aquí s'obren les **dues vessants d'investigació, la detecció UV indirecta** (apartat 5.4) i la **detecció UV directa** (apartat 5.5). En els apartats corresponents al desenvolupament de cada un dels mètodes cromatogràfics es concreta la metodologia a seguir en cada cas.

Finalment, **en capítols posteriors s'apliquen els mètodes desenvolupats a diferents mostres:** determinació d'impureses aniòniques en productes químics (colorants, dispersants naftalenisulfònics, extractes de mimoses i olis sulfatats), anàlisi d'àcids fòrmics, quantificació del contingut aniònic en pells i determinació d'anions en mostres d'altres sectors.

5.2. Instrumental, material i reactius

Algunes consideracions comunes a totes les proves

- Totes les dissolucions preparades han estat enrasades amb aigua ultra pura.
- El pH de totes les fases mòbils s'ha ajustat en les dissolucions finals ja enrasades; amb pHmetre i mitjançant una dissolució de KOH 0,5 M. Posteriorment les fases mòbils han estat filtrades amb sistema de filtració al buit i filtre de 0,45 µm.
- Les dissolucions injectades al cromatògraf s'han filtrat prèviament amb un filtre de 0,45 µm acoblat a xeringa.

INSTRUMENTAL I MATERIAL

-**Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC) amb injector automàtic i detector UV:** Water Cromatògraf líquid ALLIANCE 2695 Separations Module de WATERS equipat amb detector PhotoDiode Array (PDA) 2996 de WATERS.

-**Columna de separació:** IC-Pak A HR (High Resolution) de la casa comercial Waters. Específica per a la separació i quantificació d'anions com fluorur, clorur, nitrit, bromur, nitrat, fosfat i sulfat. Característiques de la columna: Dimensions 4,6x75 mm. Tamany de partícula 6µm. Capacitat 30 ± 3 µeq/mL. El material de rebliment és una resina de polimetacrilat amb grups funcionals amoni quaternari.

-**pH-metre** CRISON GLP 22 amb elèctrode de vidre

-**Espectrofotòmetre** VIS-UV Perkin Elmer Lambda 25

-**Filtres de disc de nylon per HPLC 0,45 µm** (per filtrar amb xeringa)

-**Filtres de membranes de fibra de vidre** de 0,45 µm (per filtrar l'eluent), (Millipore HAWP04700)

-**Xeringa** de 10 mL amb conus luer de vidre

-**Vials per HPLC** amb tap pre-slit

REACTIUS:

-Aigua ultra pura obtinguda pel procés Milli-Q de Millipore

-Acetonitril (qualitat HPLC, de Panreac)

-Patrons multielements d'anions de la casa comercial Merck:

-Anions, patró de multielements 1000 mg/l en F^- , PO_4^{3-} , Br^-

-Anions, patró de multielements 1000 mg/l Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}

-Ftalat àcid de potassi (Panreac PA)

-Hidròxid potàssic (Panreac PA)

-Sulfat sòdic (Panreac PA)

-Àcid làctic (Panreac PA)

-Nitrit sòdic (Panreac PA)

-Àcid fòrmic (Panreac PA)

-Àcid acètic (Panreac PA)

-Tetraborat sòdic (Panreac PA)

-Àcid D-glucònic, solució al 50% (Sigma Aldrich)

-Glicerina (Panreac PA)

-Hidròxid de liti (Panreac PA)

-Fases mòbils (sempre enrasades amb aigua UP)

- **Per a la detecció indirecta:** Tots els eluents de **bifthalat potàssic** s'han preparat a partir d'una dissolució mare 0,1 M en bifthalat potàssic. El pH s'ha ajustat en la dissolució final enrasada que ja contenia l'acetonitril. L'ajust s'ha realitzat amb pH-metre i amb una dissolució 0,5 M d'hidròxid potàssic. A continuació l'eluent s'ha filtrat amb membrana de fibra de vidre de 0,45 μm (Millipore HAWP04700).
- **Per a la detecció directa:**
 - o **Sulfat sòdic 1mM, 8% ACN i pH 6,8:** Preparada a partir d'una dissolució mare 1M en sulfat sòdic. El pH s'ha ajustat en la dissolució final enrasada que ja contenia l'acetonitril. L'ajust s'ha realitzat amb pH-metre i amb una dissolució 0,5 M d'hidròxid potàssic. A continuació l'eluent s'ha filtrat amb membrana de fibra de vidre de 0,45 μm (Millipore HAWP04700).

- **Borat de liti/gluconat:**
 - Dissolució concentrada borat/gluconat: Addicionar, a un matràs aforat d'un litre, 34 g d'àcid bòric, 23,5 mL d'àcid d-gluconic i 8,6 g d'hidròxid de liti monohidrat. Afegir Filtrar 500 mL d'aigua UP i dissoldre. A continuació addicionar 250 mL de glicerina i barrejar bé fins a total dissolució.
 - Enrasar amb aigua UP.
 - Eluent borat/gluconat: Introduir en un matràs aforat d'un litre 500 mL d'aigua UP i addicionar: 20 mL de la dissolució concentrada borat/gluconat, 20 mL de n-butanol i 120 mL d'acetonitril. Enrasar amb aigua ultrapura i filtrar amb membrana de fibra de vidre de 0,45 µm.

5.3. Registre d'espectres dels anions a assajar

Es van registrar els espectres d'absorció UV, en el rang de 190-400 nm, de dissolucions dels següents anions: clorur, fluorur, bromur, sulfat, nitrat, nitrit, fosfat, formiat i acetat. Les concentracions aproximades de les dissolucions d'anions van ser entre 5 a 50 ppm, en funció de l'absorbància de cada anió. Com a dissolvent es va utilitzar aigua UP. Els espectres UV obtinguts permetran:

- Comprovar quins anions són absorbents en aquesta regió de l'espectre i decidir si es podran detectar de forma directa amb el detector UV.
- Conèixer els màxims d'absorció dels anions absorbents.
- Identificar pics en els cromatogrames quan es treballi amb detecció UV directa per comparació d'aquests espectres de referència registrats, amb els espectres que proporciona el detector cromatogràfic PDA per a cada pic.

Com a exemple, es mostren els espectres UV d'una dissolució aquosa de nitrat de l'ordre de 5ppm i d'una altra d'aproximadament de 80 ppm d'acetat (Fig. 12 i Fig. 13). La resta d'espectres es recullen a l'Annex 1.

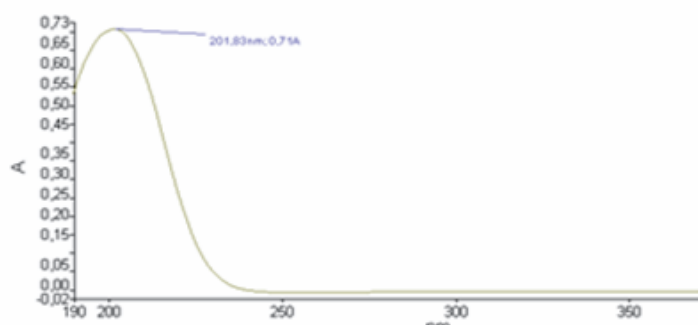


Fig. 12. Espectre UV registrat d'una solució de nitrat de concentració aproximada 5 mg/L

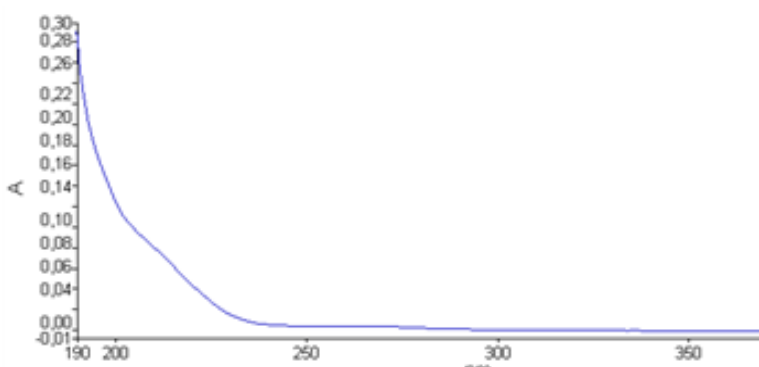


Fig. 13. Espectre UV registrat d'una solució d'acetat de concentració aproximada 80 mg/L

S'evidencia la diferència d'absorció entre aquests dos anions. L'absorbància del nitrat és molt elevada inclús a concentracions de l'ordre de 5 ppm.

A partir dels espectres registrats es confirma, com indica la literatura (71,73,151), que els anions inorgànics absorbents en l'ultraviolat són nitrat, nitrit i bromur. Els ions fluorur, clorur, fosfat i sulfat no absorbeixen en aquesta regió de l'espectre. Els anions orgànics acetat i formiat presenten una baixa absorció en l'UV.

5.4. Estudi amb detecció UV indirecta

5.4.1 Objectius

L'objectiu principal plantejat en aquest apartat és aconseguir la determinació simultània d'anions (absorbents i no absorbents) per cromatografia iònica i detecció ultraviolada indirecta. L'estudi s'inicia amb els anions inorgànics d'interès (clorur, bromur, fluorur, nitrat, nitrit, fosfat i sulfat) i posteriorment s'amplia als anions orgànics format i acetat.

Els objectius específics que permetran assolir l'objectiu principal són els següents:

- Seleccionar unes condicions inicials de treball que serveixin com a punt de partida de l'estudi.
- Demostrar, a través de proves preliminars, la viabilitat de la cromatografia iònica amb detecció UV indirecta per a la determinació simultània d'anions absorbents i no absorbents.
- Elaborar les rutines del treball cromatogràfic.
- Estudiar l'efecte dels diferents paràmetres que afecten la separació cromatogràfica.
- Definir les millors condicions per a l'anàlisi (les que permetin la separació dels anions inorgànics amb una única injecció i en el menor temps possible).
- Valorar la viabilitat de la determinació d'anions orgànics.
- Construir les rectes de calibratge per a cada anió.

5.4.2. Definició de les condicions cromatogràfiques inicials

A partir de la revisió de la literatura es van establir unes condicions cromatogràfiques inicials com a punt de partida per realitzar les primeres proves exploratòries en la investigació. En aquest apartat es defineixen i justifiquen les condicions inicials seleccionades: composició i pH de la fase mòbil, temperatura de treball, flux, volum a injectar i longitud d'ona.

ELECCIÓ DE LA FASE MÒBIL

La CI amb detecció indirecta requereix un eluent altament absorbent en l'ultraviolat. D'aquesta manera l'absorbància de l'efluent de la columna disminueix quan elueixen els anions no absorbents de la mostra. Aquesta característica de la fase mòbil s'aconsegueix mitjançant la incorporació d'espècies absorbents.

D'altra banda, l'eluent ha de ser compatible amb la columna cromatogràfica, i per aquest motiu es van tenir presents les recomanacions del fabricant de la columna (152):

- No utilitzar ni metanol, ni tetrahidrofurà.
- La concentració dels solvents orgànics no ha d'excedir el 20 %.
- No superar un 12 % d'acetonitril.
- No superar concentracions de sal 0,1 M (risc de precipitació salina en la columna).
- Quan es treballa a pH superiors a 9, utilitzar un absorbent de diòxid de carboni. L'absorció d'aquest gas per part de l'eluent es pot traduir en canvis de pH que afectarien la reproductibilitat de l'anàlisi.

Els paràmetres de la fase mòbil a definir són: espècie absorbent a incorporar i la seva concentració, solvents i pH final.

Selecció de la espècie absorbent, concentració i pH final

Es van valorar els eluents recollits a la literatura i que han estat exposats al punt 3.7.2. Els autors que han determinat anions per CI, i sobretot amb electroforesi capil·lar amb detecció indirecta, han utilitzat fases mòbils que contenien espècies absorbents tals com biftalat potàssic, àcid parahidroxibenzoic, salicilat sòdic...

En aquest estudi es van descartar les fases mòbils alcalines per evitar problemes de carbonatació de la columna: l'absorció de CO₂ ambiental a pH bàsic pot comportar canvis de pH que modifiquen els temps de retenció.

Es van realitzar els primers assajos exploratoris amb els eluents següents:

- Salicilat sòdic 1 mM a pH 5,8 (120).
- Hidrogen ftalat potàssic 2 mM a un pH 5,0, d'acord a les referències (117) i (118) citades a la Taula 8 de la secció 3.7.2.

La fase mòbil salicilat sòdic es va excloure perquè va produir pitjors resultats que l'eluent d'hidrogen ftalat.

Així doncs, per les proves preliminars, es va seleccionar l'**hidrogen ftalat potàssic** com a espècie absorbent a una concentració **2 mM** i a un **pH 5,0 ± 0,2**. (La tolerància ±0,2 en el pH dels eluents és l'acceptada per l'A.E.F.I (130)).

Selecció del solvent

L'elecció dels solvents en cromatografia depèn de diversos factors com per exemple el tipus de cromatografia, el tipus de detector i la compatibilitat amb el sistema cromatogràfic. La interacció del solvent amb la fase estacionària ha de ser òptima i la separació cromatogràfica ha de tenir lloc en un temps suficientment baix.

Alguns dels paràmetres que determinen el tipus de dissolvent a emprar són: viscositat, absorció en l'UV, punt d'ebullició, índex de refracció, inèrcia front la mostra, resistència a la corrosió, toxicitat, preu i manteniment.

L'**aigua UP** és el solvent inorgànic més emprat en CI i es caracteritza per la seva elevada polaritat. Sovint s'incorporen quantitats de modificadors orgànics per aconseguir disminuir possibles interaccions no iòniques i també per obtenir altres propietats (153).

Les especificacions de la columna iònica emprada en aquest treball indiquen que la fase mòbil pot contenir solvents miscibles en aigua per reduir interaccions hidrofòbiques entre la mostra i el rebliment, sempre i quan es respectin els requeriments de la columna citats anteriorment.

Els dos solvents orgànics més usats en HPLC són l'**acetonitril** i el metanol perquè presenten característiques adequades: baixa viscositat, punts d'ebullició relativament alts, inerts respecte a la majoria d'analits, possibilitat d'obtenir-los ultra purs, molt bona solubilitat (154) i transparents a l'UV, especialment l'acetonitril.

Atès que el metanol és incompatible amb la columna IC-Pak A HR, es va optar per l'acetonitril. Aquest solvent dissol una àmplia gama de compostos iònics i no polars, per això és molt útil com a modificador de la fase mòbil en CI, a més de les altres propietats comentades (baixa viscositat, baixa afinitat química.....). La poca viscositat de l'acetonitril permet una pressió de treball relativament baixa.

Un altre aspecte que cal considerar en la fase mòbil és el temps de vida òptim perquè no es produeixi creixement microbià que podria obstruir components del cromatògraf i provocar interferències cromatogràfiques. Els dissolvents contaminats o el creixement microbià en les ampolles dels eluents poden taponar els filtres, perjudicar el funcionament de la bomba i bloquejar l'automostrejador, provocant variacions en els volums injectats i reduint la sensibilitat. L'acetonitril actua com a bactericida. Hi ha diverses opinions respecte al contingut adequat d'acetonitril: alguns autors indiquen que l'addició de només el 5% de dissolvent orgànic és suficient per suprimir el creixement bacterià; d'altres aconsellen valors entre 5-10% i alguns inclús recomanen un contingut superior al 10% per tenir una garantia total d'absència de contaminació bacteriana (101,155,156).

En aquest treball, s'ha de tenir present la limitació de la columna IC-Pak A HR de no admetre fases mòbils amb un percentatge d'acetonitril superior al 12 %.

La majoria de laboratoris coincideixen en establir un període de venciment de la fase mòbil entre una i dues setmanes.

Fase mòbil seleccionada

Ateses les anteriors consideracions, es va decidir iniciar l'estudi amb un eluent **2mM en biftalat potàssic**, amb **6 % (v/v) d'acetonitril i aigua com a solvent majoritari**. El **pH final** de la fase mòbil es va ajustar a un valor de **5,0 ± 0,2** (veure preparació de l'eluent a l'apartat 5.2).

ELECCIÓ DE LA TEMPERATURA

Al punt 3.5 s'ha explicat la importància de la temperatura en cromatografia iònica. Canvis en aquest paràmetre poden alterar tots els equilibris i processos de transport que intervenen en una separació cromatogràfica. Un control de la temperatura millora l'eficiència cromatogràfica.

Les especificacions de la columna estableixen l'interval de temperatures de treball entre 10 i 50° C; tot recomanant els 25° C com a temperatura normal d'operació. Per aquest motiu les primeres injeccions es van realitzar a **24 ± 1 °C**.

ELECCIÓ DEL FLUX I DEL VOLUM D'INJECCIÓ

Autors que han avaluat la relació entre el flux i la separació cromatogràfica amb detecció indirecta han conclòs que fluxos elevats disminueixen el temps de retenció (80). Ja que la columna emprada no permet excedir un flux de 1,0 ml/min (152) (valors superiors poden malmetre-la amb el temps), es va decidir treballar a valors de flux compresos entre el 90%-100% acceptats per la columna per tal de:

- Respectar les condicions de treball recomanades en el manual de la columna i allargar la vida d'aquesta.
- Obtenir els menors temps de retenció possibles i així incrementar la productivitat.

Es va seleccionar un flux de **0,9 mL/min**, d'acord amb els raonaments anteriors.

En les primeres proves es van injectar **20 µL**.

SELECCIÓ DE LA LONGITUD D'ONA DE TREBALL

Quan s'utilitza la detecció UV indirecta, la longitud d'ona de mesura depèn de la composició de l'eluent.

Es va registrar l'espectre ultraviolat de la fase mòbil diluïda (20 ppm en ftalat àcid de potassi) per disposar d'informació espectral d'aquest eluent (Fig. 14). S'observa un màxim a 196,1 nm.

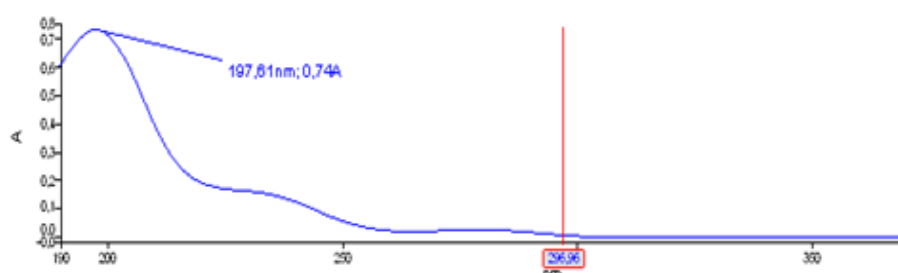


Fig. 14. Espectre UV d'una dissolució de 20 mg/L de ftalat àcid de potassi

En un principi es pensava treballar a la longitud d'ona de màxima absorbància de la fase mòbil, tal i com recomana la bibliografia per a la detecció UV indirecta en CI (80). Després de realitzar algunes injeccions amb la fase mòbil seleccionada (2mM de

biftalat 6% (v/v) d'acetonitril i pH 5,0) es va comprovar la impossibilitat de treballar a longituds d'ona inferiors a 254 nm perquè l'excés de soroll no permet distingir els pics dels analits en el cromatograma, tal com es mostra a la Fig. 15.

En aquest sentit, s'ha trobat que altres autors han emprat longituds d'ona superiors a 260 nm per determinar anions amb detecció indirecta (80,117,118). Aquest fet recolza els resultats obtinguts.

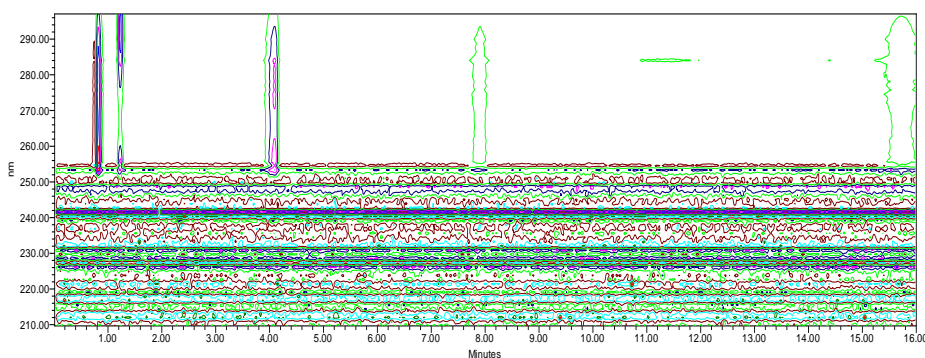


Fig. 15. Cromatograma tridimensional de diferents anions amb fase mòbil 2mM biftalat, 6% (v/v) d'acetonitril i pH final 5,0

Es va optar per capturar el cromatograma a **260 nm** en les proves inicials. Però, cal tenir present que el software disposa d'una funció que permet recuperar cromatogrames a qualsevol longitud d'ona dins del rang enregistrat.

5.4.3. Resum de les condicions cromatogràfiques inicials seleccionades

La Taula 11 resumeix les condicions inicials seleccionades, basades en els raonaments de l'apartat anterior. Aquestes condicions s'empraran en les proves preliminars.

Condicions cromatogràfiques inicials per a la realització de les proves preliminars	
Fase mòbil	Ftalat àcid de potassi 2mM amb un 6 % [v/v] d'acetonitril i pH $5,0 \pm 0,2$
Temperatura de la columna	$24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
Flux	0,9 mL/min
Volum d'injecció	20 μL
Longitud d'ona emprada de Captura del cromatograma	260 nm
Rang de longitud d'ona	200-400 nm

Taula 11. Condicions inicials seleccionades per a les proves preliminars

5.4.4. Proves analítiques preliminars

Aquestes primeres proves prèvies, amb les condicions de la Taula 11, permetran:

- Establir la posada a punt de la columna cromatogràfica.
- Invertir la resposta del detector per obtenir pics positius integrables pel software del cromatògraf.
- Familiaritzar-se amb la detecció indirecta, ja que no hi ha cap publicació que utilitzi el mateix cromatògraf ni la mateixa columna que els emprats en aquest treball.
- Orientar l'enfocament posterior de l'estudi.

INVERSIÓ DE LA RESPOSTA DEL DETECTOR

La detecció ultraviolada indirecta proporciona pics cromatogràfics negatius que són difícilment integrables pel software. S'ha de programar el cromatògraf perquè inverteixi la resposta del detector i presenti un gràfic amb pics positius. D'altra manera, els pics negatius obtinguts requeririen una integració manual de les àrees.

La inversió s'ha resolt mitjançant el software de captura de cromatogrames en 2 dimensions. La resposta del detector s'ha multiplicat per un factor de (-1) a la longitud d'ona de treball. Les figures Fig. 16 i Fig. 17 mostren un cromatograma d'un mateix patró multicomponent abans i després de la inversió, respectivament.

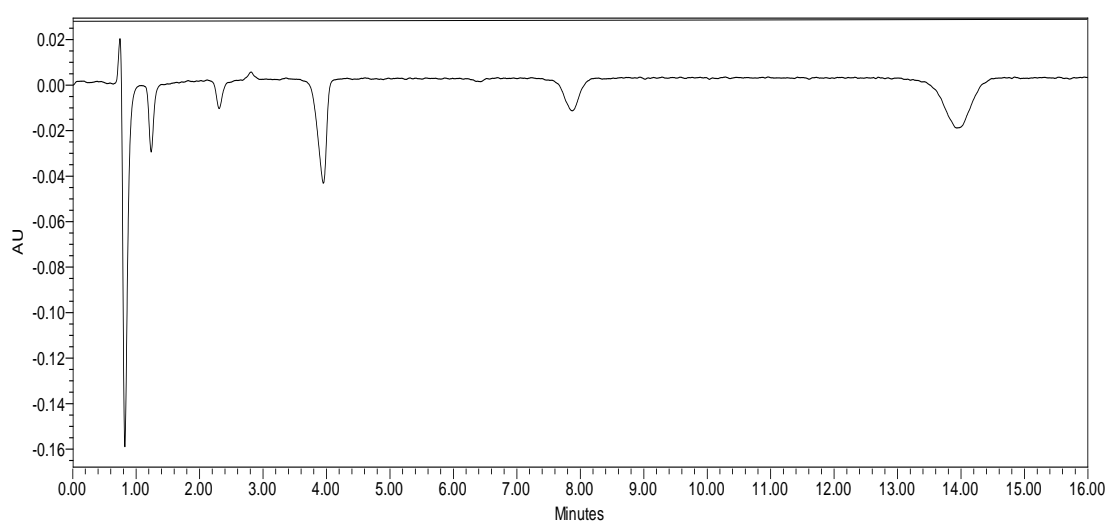


Fig. 16. Cromatograma d'un patró amb anions inorgànics (nitrit, nitrat i sulfat) abans d'invertir la resposta del detector

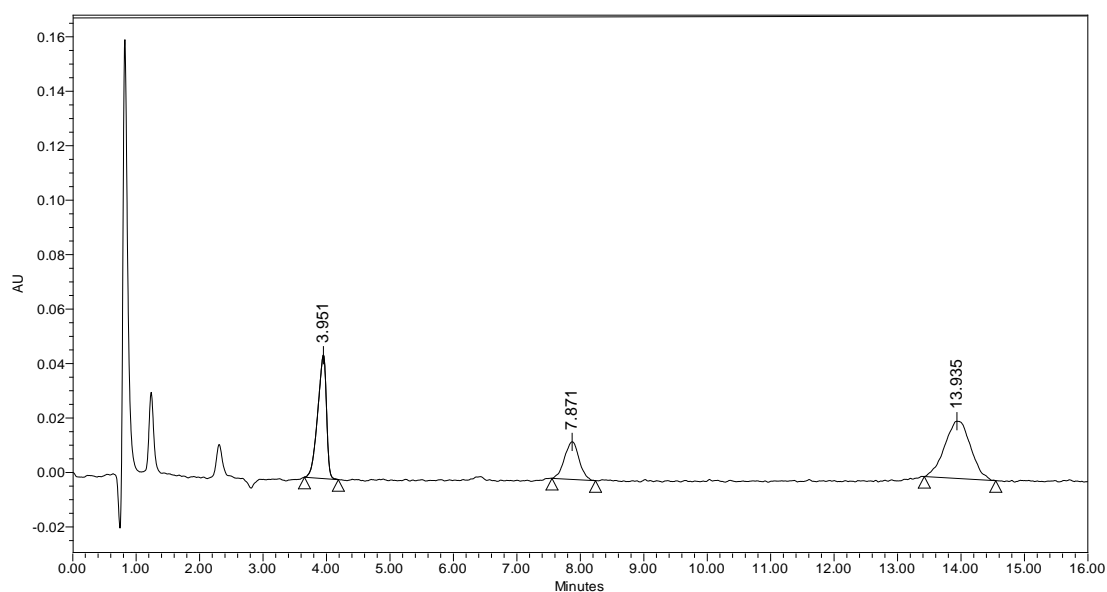


Fig. 17. Cromatograma d'un patró amb anions inorgànics (nitrit, nitrat i sulfat) després d'invertir la resposta del detector

POSADA A PUNT DE LA COLUMNA

El primer pas en una anàlisi cromatogràfica és l'equilibrat de la columna amb la fase mòbil de treball. L'equilibrat té com a finalitat condicionar la fase estacionària per assolir les condicions inicials desitjades abans d'injectar els analits (apartat 3.6). Quan s'assoleix l'equilibri, tota la fase estacionària es troba associada a ions complementaris (92). Va ser necessari establir el temps d'equilibrat inicial adequat.

Amb un equilibrat de 15 minuts s'observava sempre en el cromatograma de la primera injecció d'una sessió de treball un pic fantasma d'origen desconegut (Fig. 18). En injeccions consecutives no apareixia aquest pic.

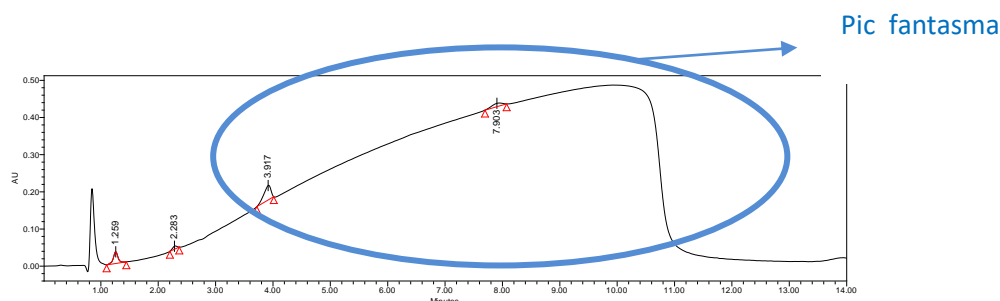


Fig. 18. Pic fantasma obtingut en la primera injecció d'una sessió de treball realitzant un equilibrat inicial de 15 minuts

Es va solucionar aquest problema augmentant el temps d'equilibrat inicial fins a 30 minuts: s'evitava l'aparició del pic fantasma en la primera injecció i s'obtenia una línia de base estable.

En totes les anàlisis es va realitzar un equilibrat de 5 minuts entre injeccions.

En finalitzar cada sessió de treball es recomana un rentat amb aigua ultra pura per evitar possibles cristallitzacions de biftalat en la columna cromatogràfica (provocades per evaporació d'aigua). Aquesta precaució ajuda a una adequada conservació de la columna.

PRIMERES INJECCIONS

Les primeres injeccions, de caràcter qualitatiu, es van fer amb un patró multi component de Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , F^- , PO_4^{3-} i Br^- a concentracions entre 2-20 mg/L. Totes les injeccions es fan per triplicat i amb les condicions dels apartats 5.4.3. El cromatograma obtingut, Fig. 19, demostra la possibilitat d'obtenir pics positius per cromatografia iònica i detecció UV indirecta amb les condicions emprades.

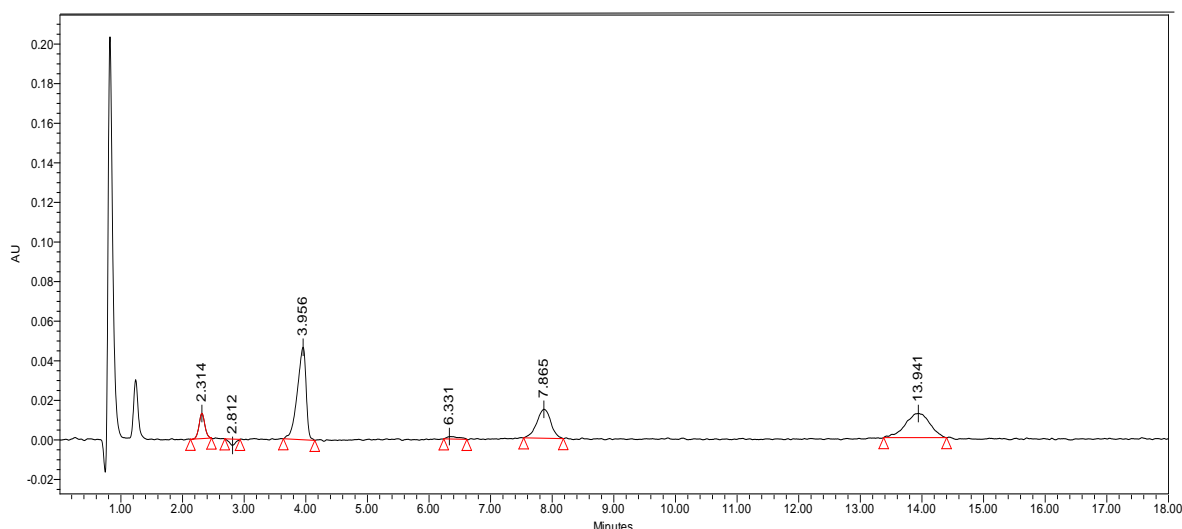


Fig. 19. Cromatograma d'un patró multicomponent de PO_4^{2-} , F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} . Condicions de la Taula 11

S'observen sis pics, tot i que el patró injectat tenia set components. Es van realitzar més injeccions augmentant el temps total de l'anàlisi per possibilitar la sortida del setè anió (en cas que tingués un temps de retenció superior a la durada de l'anàlisi). El resultat va ser idèntic, la qual cosa va permetre suposar l'existència d'un solapament de dos pics en el cromatograma.

IDENTIFICACIÓ DELS TEMPS DE RETENCIÓ ASSOCIATS ALS ANIONS

Es van injectar patrons individuals dels diferents analits a una concentració de l'ordre de 40 ppm amb la finalitat d'identificar els temps de retenció corresponent a cada anió. La Taula 12 mostra els resultats.

Anió	Temps de retenció [minuts]
Fosfat	2,31
Fluorur	2,41
Clorur	2,81
Nitrit	3,96
Bromur	6,33
Nitrat	7,87
Sulfat	13,9

Taula 12. Temps de retenció dels patrons a concentracions de 40 ppm segons les condicions cromatogràfiques de la Taula 11

S'aprecia que els anions fosfat i fluorur, en les condicions cromatogràfiques emprades, presenten temps de retenció molt propers. Aquest fet es manifesta en un solapament

dels pics en el cromatograma (Fig. 19). La resta d'analits no mostren solapaments aparents.

L'ordre d'elució és l'esperat segons la teoria de la cromatografia iònica:

- Els anions que provenen d'electròlits forts presenten temps de retenció superiors que els anions provinents d'àcids febles (fosfat, fluorur).
- Els anions polivalents presenten major afinitat per la resina aniònica que els anions monovalents, fet que es tradueix en un major temps de retenció per a aquests ions.
- Entre anions de la mateixa càrrega, són més retinguts els anions de menor tamany (5). Els intercanviadors iònics afavoreixen la unió de ions de major càrrega i radi inferior (97).

CÀLCUL DEL NOMBRE DE PLATS TEÒRICS PER L'ANIÓ SULFAT

El nombre de plats teòrics (N) és un paràmetre que mesura l'eficàcia del sistema cromatogràfic en relació al nombre de pics que poden aparèixer en el cromatograma per unitat de temps i per tant, mesura la capacitat del sistema per proporcionar bandes d'elució estretes (130). A major valor de N, millor és la separació.

Es va determinar el nombre de plats teòrics per l'anió sulfat (el manual de la columna cromatogràfica proporciona dades d'eficàcia d'aquest anió). El càlcul de N es va realitzar mitjançant l'opció del software del cromatògraf i emprant l'equació proposada per la farmacopea europea (Fig. 20).

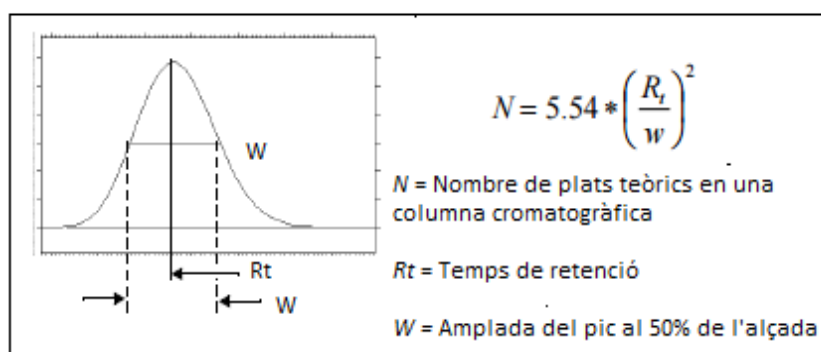


Fig. 20. Equació del càlcul de plats teòrics EP (farmacopea europea). Font: Opción de software de adecuabilidad del sistema (System Suitability)de Empower, Guía rápida Waters, p.23

Es va obtenir un valor de N de 8000, superior al valor de referència de 2500 proporcionat pel manual de la columna (152).

5.4.5. Conclusions de les proves preliminars

- La cromatografia iònica amb detecció UV indirecta és apta per determinar anions inorgànics en les condicions seleccionades (Taula 11).
- És possible obtenir pics positius integrables quan la resposta del detector es multiplica per un factor de (-1).
- En les injeccions realitzades els senyals dels pics són molt superiors al soroll.
- Es determina que cal un equilibrat inicial de 30 minuts per aconseguir una línia de base plana.
- Els cromatogrames recuperats a longituds d'ona inferiors a 254 nm no són adequats degut a l'excés de soroll que presenten.
- Les condicions cromatogràfiques emprades no permeten diferenciar entre els anions fluorur i fosfat. Es produeix un solapament de pics; els dos analits proporcionen la mateixa resposta. Un dels objectius propers serà determinar el pH òptim per aconseguir la resolució d'aquests dos ions.
- El sulfat proporciona un valor de plats teòrics de 8000; superior al valor de referència per a aquesta columna, que és de 2500.

Aquestes proves van permetre establir l'enfocament posterior de l'experimentació. Tot seguit es va estudiar la influència dels diferents paràmetres que afecten la cromatografia per determinar unes condicions adequades que separin tots els anions en el menor temps possible.

5.4.6. Estudi de la influència dels factors que afecten la separació cromatogràfica

Es va estudiar l'efecte dels principals factors que afecten la separació cromatogràfica amb l'objectiu de definir unes condicions que permetessin determinar simultàniament i en el menor temps, els set anions inorgànics a assajar: clorur, bromur, fluorur, fosfat, sulfat, nitrat i nitrit.

Els paràmetres avaluats van ser: temperatura, composició de la fase mòbil (% d'acetonitril en la fase mòbil i % d'espècie absorbent), pH de la fase mòbil, i volum d'injecció.

En cada assaig es cromatografiaren per duplicat 20 µL d'un **patró multicomponent de concentració de l'ordre de 40 ppm en cada un dels set anions** d'interès. Les proves es van realitzar segons les condicions de la Taula 11.

Influència de la temperatura

Com s'ha explicat a l'apartat 3.5, la temperatura de la columna és un factor a considerar en HPLC.

Es va cromatografiar el patró a diferents temperatures (24, 27 i 30°C) i emprant la fase mòbil de biftalat potàssic 2mM amb un 8% d'acetonitril i pH 5,2. L'estudi es va repetir també amb percentatges d'acetonitril del 6% i del 10%. En cap cas es van apreciar diferències importants en els temps de retenció dels anions, tot i que s'observa una lleugera disminució d'aquest paràmetre quan augmenta la temperatura, tal com reflecteixen les dades de la Fig. 21 i de la Taula 13. Totes les fases mòbils assajades van presentar la mateixa tendència en els resultats.

Les dades de temps de retenció del anions fluorur i fosfat es van aconseguir a través d'injeccions de patrons individuals degut a que en el cromatograma del patró multicomponent no es van separar aquests analits.

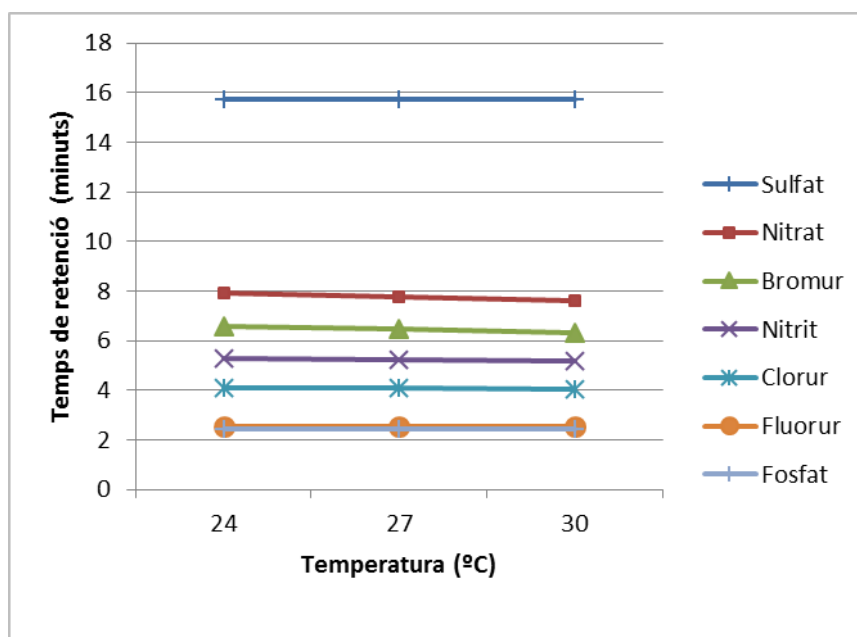


Fig. 21. Variació del temps de retenció amb la temperatura (fase mòbil hidrogen ftalat potàssic 2m M amb un 8% d'acetonitril i pH 5,2, 260nm)

Temperatura (° C)	Temps de retenció (minuts)						
	Fosfat	Fluorur	Clorur	Nitrit	Bromur	Nitrat	Sulfat
24	2,429	2,529	4,091	5,286	6,573	7,903	15,74
27	2,424	2,527	4,068	5,239	6,477	7,783	15,71
30	2,422	2,528	4,036	5,167	6,339	7,596	15,71

Taula 13. Influència de la temperatura sobre el temps de retenció (fase mòbil hidrogen ftalat potàssic 2m M amb un 8% d'acetonitril i pH 5,2, 260nm)

També es va calcular el nombre de plats teòrics (equació de la Fig. 20) a diferents temperatures i per als pics de tots els anions. Es va comprovar que la temperatura no afecta aquest paràmetre (Taula 14).

T ^a /Anions	Nombre de plats teòrics						
	Fosfat	Fluorur	Clorur	Nitrit	Bromur	Nitrat	Sulfat
24	2795	1661	3480	4022	5181	5541	8077
27	2845	1648	3471	4147	5132	5262	9140
30	2901	1655	3440	4044	5303	5496	8740

Taula 14. Nombre de plats teòrics a diferents temperatures per als analits assajats

Tot i que en el rang de temperatures estudiat no influeix en el temps de retenció ni en el nombre de plats teòrics, és recomanable un control d'aquest paràmetre per aconseguir resultats reproduïbles. Les diferències de temperatura ambiental en les distintes èpoques de l'any podrien variar la viscositat de la fase mòbil i per tant, els resultats cromatogràfics.

Es va decidir optar per la temperatura de **30 °C** perquè és més fàcil reproduir-la en les diferents èpoques de l'any. Si es treballés per exemple a 24°C podria donar-se el cas que algun dia d'estiu calgués refrigerar la columna per aconseguir l'esmentat valor. El cromatògraf disposa de forn amb sistema de calefacció, però no de refrigeració.

Influència del contingut d'acetonitril de la fase mòbil

Es van avaluar tres fases mòbils, totes amb una concentració 2mM de ftalat àcid de potassi, continguts creixents d'acetonitril (6%, 8% i 10%) i pH final de 5,0. Les proves es van realitzar a 30°C.

El rang de valors d'acetonitril estudiat va produir poques diferències en els temps de retenció dels anions (Taula 15 i Fig. 22). L'analit més afectat, el sulfat, presenta menor temps a un 8% d'acetonitril. En cap de les proves es va aconseguir la separació entre fosfat i fluorur (els temps de retenció d'aquests dos ions es van obtenir amb injeccions de patrons individuals).

% acetonitril	Temps de retenció dels anions en minuts						
	Fosfat	Fluorur	Clorur	Nitrit	Bromur	Nitrat	Sulfat
6%	2,605	2,696	4,317	5,501	6,767	8,098	18,45
8%	2,423	2,476	3,981	5,067	6,226	7,455	15,03
10%	2,660	2,776	4,426	5,579	6,865	8,117	20,34

Taula 15.Efecte del contingut d'acetonitril sobre el temps de retenció (fase mòbil 2mM ftalat àcid de potassi a pH 5,0. Temperatura 30°C, 15 µL, 260nm)

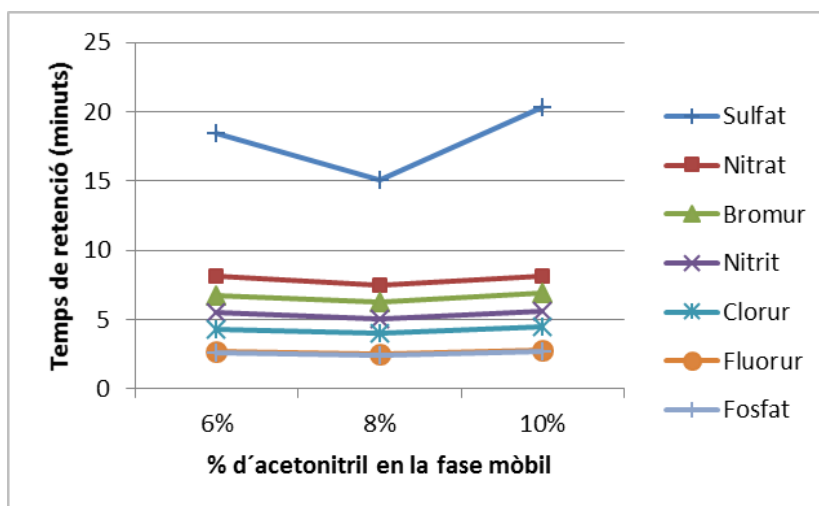


Fig. 22.Representació gràfica de la variació del temps de retenció en funció del percentatge d'acetonitril (fase mòbil 2mM ftalat àcid de potassi a pH 5,0. Temperatura 30°C, 15 µL, 260nm)

La comparativa del nombre de plats teòrics a diferents valors d'acetonitril tampoc presenta diferències importants, com es mostra a la Fig. 23.

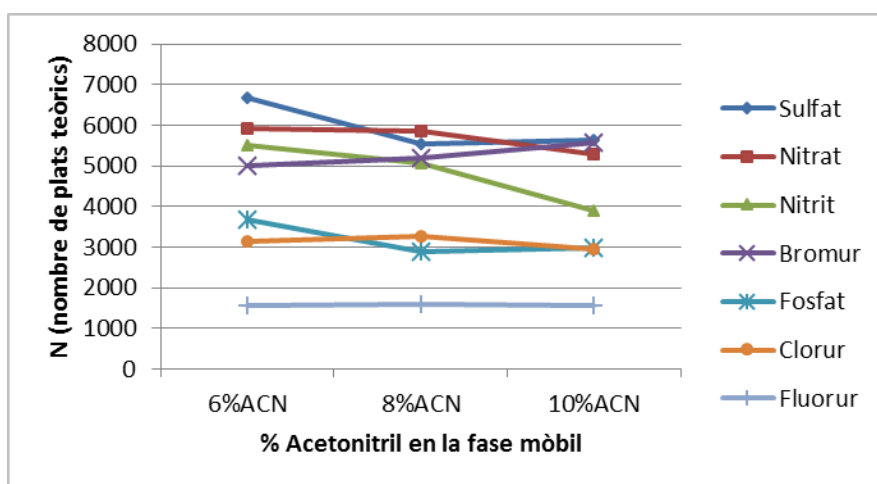


Fig. 23. Representació gràfica de l'efecte del contingut d'acetonitril de la fase mòbil sobre el nombre de plats teòrics per als analits estudiats amb l'eluent 2mM ftalat àcid de potassi, pH 5,0, 30°C i 260 nm

Es van repetir les proves a pH 5,2 i es va observar la mateixa tendència en els resultats.

Dels resultats de l'estudi sobre la influència del contingut d'acetonitril es conclou:

- Cap de les proves realitzades permet una separació de tots els analits: els pics del fosfat i del fluorur encara no es resolen. L'eluent amb un 10% d'acetonitril mostra major diferència entre els temps de retenció d'aquests dos analits.
- Als valors de pH estudiats, 5,0 i 5,2, no s'observen diferències en els temps de retenció proporcionats per les fases mòbils que contenen 6% i 8% d'acetonitril. L'eluent al 10% d'acetonitril proporciona temps de retenció lleugerament superiors. La principal diferència s'aprecia en l'anió sulfat.
- En principi, el valor de 8% d'acetonitril proporciona el menor temps total d'anàlisi; aquest ve marcat per l'últim analit que elueix, el sulfat. Després de comparar el nombre de plats teòrics per a cada pic als diferents percentatges d'acetonitril i als dos valors de pH assajats, no s'observen diferències substancials. Per tant, el nombre de plats teòrics no es un paràmetre determinant en la selecció el % d'acetonitril.
- En resum, hi ha poques diferències de temps de retenció en el rang de valors d'acetonitril estudiat. Segons les necessitats de l'anàlisi es pot recomanar una o altra fase mòbil:

- ✓ 8% d'acetonitril si es busca el menor temps d'anàlisi.
- ✓ 6% si es prioritzen aspectes econòmics (menor cost de dissolvent).
- ✓ 10% si hi ha problemes de sensibilitat (aquest valor proporciona àrees superiors) i també en l'anàlisi de mostres reals que continguin moltes substàncies orgàniques. Aquestes substàncies poden acumular-se en la columna i embrutar-la. Continguts elevats de dissolvent orgànic eviten aquest inconvenient.

En qualsevol cas, el fet que els resultats variïn poc en funció del contingut d'acetonitril significa que el mètode cromatogràfic serà robust respecte a aquesta variable.

A l'hora d'establir un valor definitiu d'acetonitril en el protocol final, es prefereix un 8% perquè és la millor opció tenint en compte el factor econòmic i la protecció microbiana. (En l'apartat 5.4.2, en l'etapa de selecció del solvent, es va tractar la protecció microbiana).

Influència del pH de la fase mòbil

El pH és un factor important perquè pot desplaçar equilibris químics i modificar la càrrega de les espècies a analitzar, i per tant, influir en la retenció cromatogràfica dels analits (veure apartat 3.5).

Es va avaluar l'efecte de l'eluent 2 mM en biftalat potàssic amb un 10% d'acetonitril a diferents valors de pH (5,0, 5,2 i 6,5). La identitat de cada pic es va confirmar mitjançant la tècnica d'adició de patró.

Es mostra el cromatograma obtingut a pH 6,5 (Fig. 24) i l'efecte del pH sobre el temps de retenció (Fig. 25).

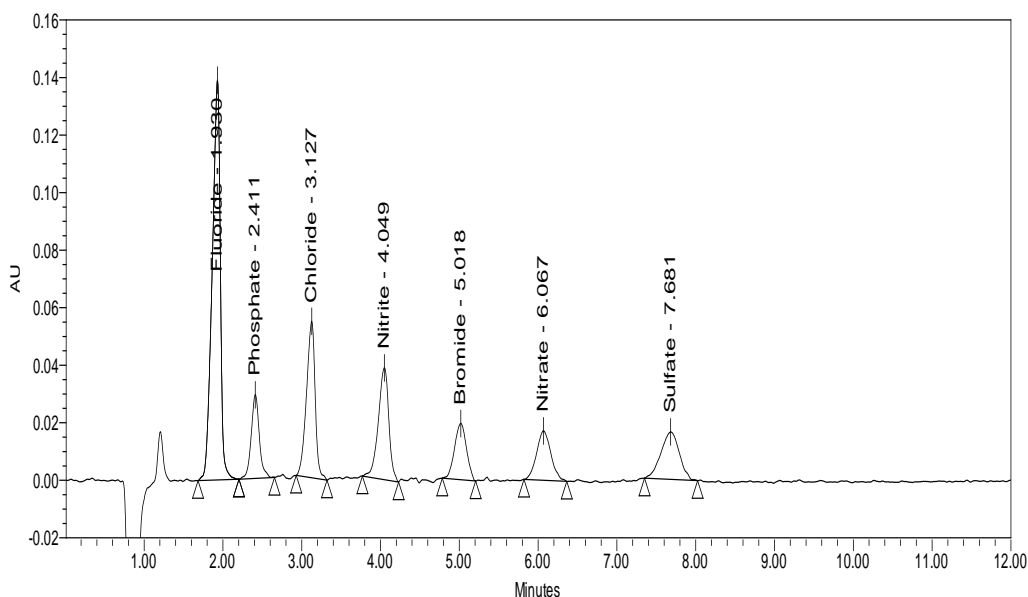


Fig. 24. Cromatograma obtingut amb la fase mòbil 2mM en ftalat àcid de potassi al 10% acetonitril (v/v) i pH 6,5 a 30°C

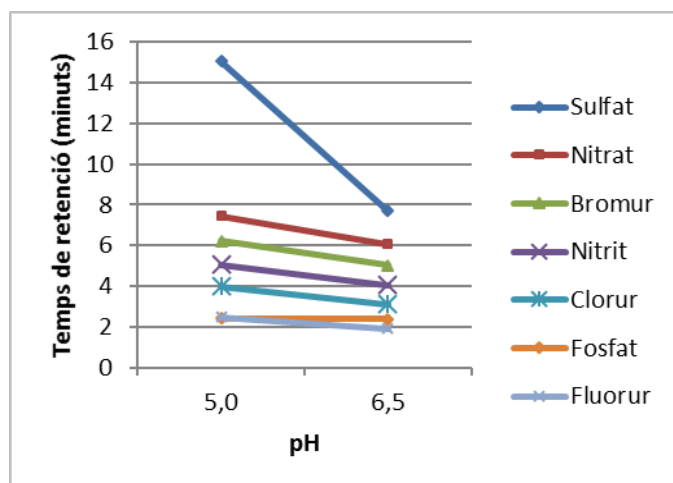
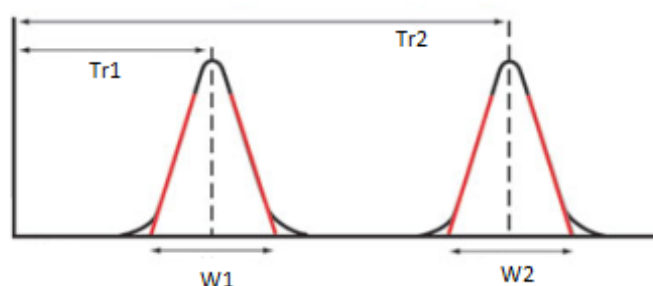


Fig. 25. Influència del pH sobre el temps de retenció (fase mòbil 2 mM en ftalat àcid de potassi 10 % acetonitril)

El cromatograma obtingut a pH 6,5 va proporcionar 7 pics, la qual cosa significa que s'ha produït la separació entre l'anió fluorur i el fosfat (Fig. 24).

Es va calcular també la resolució (R) entre cada dos pics veïns segons la fórmula de la Fig. 26. La resolució és un paràmetre que mesura la eficàcia de la separació entre dos pics consecutius. Es considera que queden ben resolts quan el seu valor és superior a 1,5 (130,157).



$$R = 2 (Tr1 - Tr2) / (W1 + W2)$$

R: Resolució

Tr1: Temps de retenció del pic 1

Tr2: Temps de retenció del pic 2

W1: Amplada del pic 1

W2: Amplada del pic 2

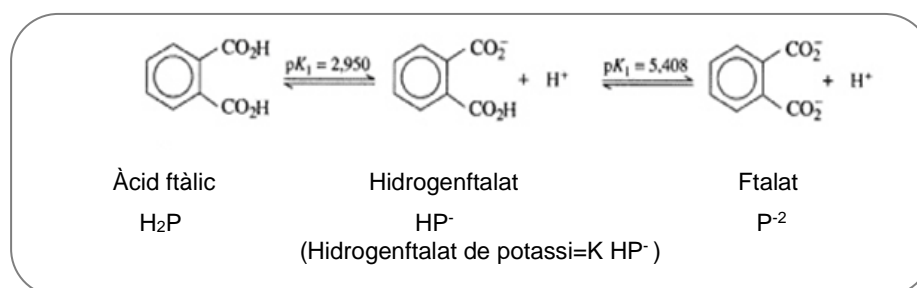
Fig. 26. Càlcul de la resolució entre dos pics cromatogràfics consecutius

S'evidencia com a pH 6,5:

- Té lloc la separació de tots els analits (inclús fluorur i fosfat) i amb una resolució superior a 1,5 entre cada dos pics consecutius.
- Disminueix el temps de retenció de tots els anions, excepte el del fosfat, que roman invariable.

Els efectes del pH sobre el temps de retenció poden justificar-se en termes d'equilibris químics:

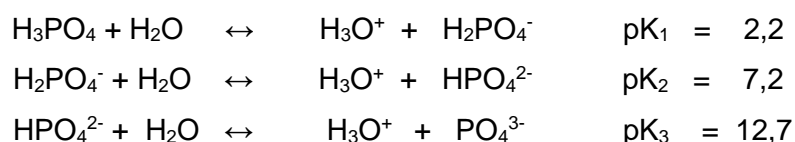
- La resina intercanviadora no es veu afectada per l'augment de pH perquè té caràcter fort. Els seus grups estan totalment ionitzats a qualsevol valor de pH. La seva càrrega positiva no ha variat.
- L'augment de pH tampoc afecta la ionització dels electròlits forts analitzats (sulfat, nitrat, bromur, nitrit, clorur). Aquests continuen totalment ionitzats.
- El canvi de pH afecta la ionització del ftalat àcid de potassi (electròlit de la fase mòbil). El seu equilibri d'hidròlisi es veu desplaçat de manera que es produeix un augment de la fracció de biftalat que es troba ionitzada com a ftalat (major càrrega negativa) (5):





Això produeix més interacció entre l'electròlit de la fase mòbil i les càrregues positives de la columna cromatogràfica. Hi ha més grups de la resina intercanviadora bloquejats pels ions provinents del biftalat. La resina no disposa de tantes càrregues positives lliures. Per tant, la interacció entre els analits forts i la resina és menor, la qual cosa es tradueix en una disminució del temps de retenció dels electròlits amb caràcter fort.

-El canvi de pH també afecta l'anió fosfat perquè l'àcid fosfòric és un àcid feble polifuncional (158). Un augment de pH modifica els equilibris químics que presenta aquesta espècie provocant un augment de la ionització i una variació de la densitat de càrrega negativa:



L'increment de pH suposa una disminució dels ions hidroni i els anteriors equilibris es desplacen cap a la dreta segons el Principi de Le Chatelier. Augmenta la càrrega negativa de la fracció ionitzada i, en principi, aquest analit és més atret per les càrregues positives de la resina intercanviadora i el seu temps de retenció hauria d'augmentar.

Però recordem que, d'altra banda, degut a l'efecte del biftalat, la resina presenta menys grups positius i els analits són menys retinguts (menor temps de retenció).

En resum, el canvi de pH provoca dos efectes oposats sobre l'analit fosfat :

- 1) La tendència a disminuir el seu temps de retenció com a conseqüència del bloqueig d'alguns punts de la resina per part del biftalat.
- 2) La tendència a augmentar el temps de retenció perquè es troba més ionitzat i amb més càrrega negativa.

Aquests efectes es compensen i l'efecte global de l'augment de pH sobre el temps de retenció del fosfat és nul.

-L'anió fluorur és també un electròlit feble i en augmentar el pH incrementa el grau de ionització. Però, atès que la seva densitat de càrrega negativa no es veu afectada, un increment de pH disminueix el temps de retenció d'aquest analit.

Influència de la concentració de la espècie absorbent en la fase mòbil sobre el temps de retenció i el límit de detecció

Fins ara, totes les proves han estat realitzades a concentració 2 mM de ftalat àcid de potassi (espècie absorbent) en l'eluent. A l'apartat 5.4.3 s'ha raonat l'elecció d'aquesta concentració. Per tal de determinar si la concentració de biftalat potàssic afecta el resultat cromatogràfic, es van comparar els cromatogrames obtinguts amb les següents fases mòbils:

- 1mM biftalat amb 8% acetonitril i pH 5,5.
- 1mM biftalat amb 8% acetonitril i pH 6,2.
- 2mM amb 10% acetonitril i pH 6,5.

Les injeccions amb l'eluent 1mM i pH 5,5 no van permetre la separació total dels analits fosfat i fluorur. Les altres dues fases mòbils van separar tots els anions.

La Fig. 27 mostra un cromatograma obtingut amb la fase mòbil 1mM en ftalat àcid de potassi, 8% d'acetonitril i pH 6,18 i la Fig. 28 compara els temps de retenció proporcionats pels eluents que han permès la separació de tots els anions (1mM biftalat amb 8% acetonitril a pH 6,18 i 2mM amb 10% acetonitril a pH 6,50.

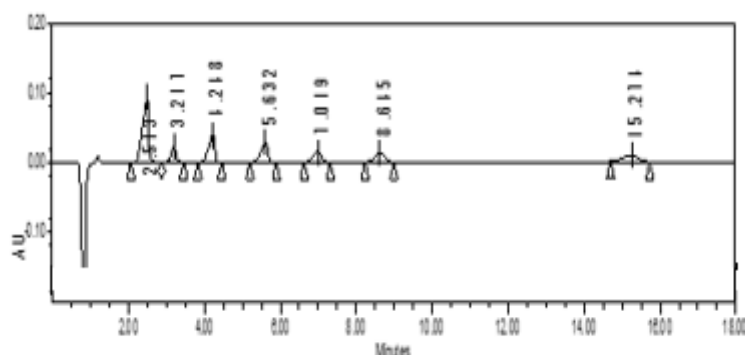


Fig. 27. Cromatograma d'un patró que conté fluorur, fosfat, clorur, nitrat, nitrit, bromur i sulfat obtingut amb la fase mòbil 1mM en ftalat àcid de potassi, 8% d'acetonitril i pH 6,18

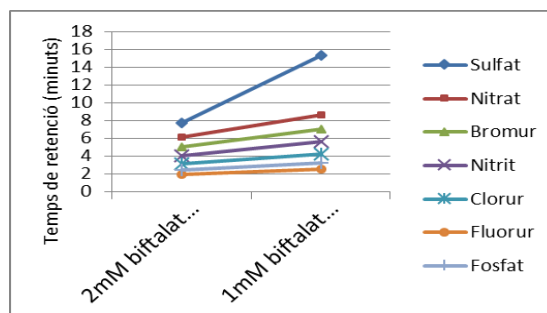


Fig. 28. Efecte de la composició de la fase mòbil en el temps de retenció. Volum d'injecció 15 µL. Concentració aproximada de cada analit: 40 ppm

L'eluent **2 mM de biftalat a pH 6,5** va proporcionar menors temps de retenció en tots els anions i per tant, va aconseguir **menor temps total** d'anàlisi (7,7 minuts front als 15 minuts obtinguts amb la fase mòbil 1mM a pH 6,2). L'ió sulfat és el que presenta més diferències en els temps de retenció.

La comparativa entre les àrees dels pics dels cromatogrames adquirits amb les dues fases mòbils que han separat els set anions de l'estudi, 1mM a pH 6,2 i 2mM a pH 6,5, va mostrar àrees superiors en el cas de l'eluent 1mM. Per quantificar aquestes diferències es va determinar el **límit de detecció** per als anions clorur, nitrat, sulfat i fosfat amb ambdós eluents i segons el mètode descrit a l'apartat 4.3.3. Els resultats es presenten a la Taula 16.

Anions	Límits de detecció (mg/L)	
	Fase mòbil 1mM Biftalat potàssic, 8% ACN, pH 6,2 (260nm)	Fase mòbil 2mM Biftalat potàssic, 8% ACN, pH 6,5 (260nm)
Clorur	0,10	0,41
Nitrat	0,30	0,99
Fosfat	0,42	1,07
Sulfat	0,75	1,54

Taula 16. Límits de detecció de diversos anions a diferents concentracions de la fase mòbil

D'altra banda, es va calcular la resolució entre cada dos pics consecutius en els cromatogrames obtinguts amb ambdues fases mòbils. El càlcul es va fer d'acord amb la fórmula de la Fig. 26 i en tots els casos la resolució va ser superior a 1,5.

Després de valorar els resultats i comparar els cromatogrames, es conclou:

- El temps total d'anàlisi a concentració 1mM de biftalat i pH 6,2 és superior al temps obtingut a 2 mM de biftalat i pH 6,5 (15 minuts front als 7,7 minuts obtinguts amb l'eluent concentrat).
- La concentració 1 mM de biftalat potàssic proporciona millors límits de detecció.

En definitiva, la concentració 1mM en biftalat aporta major sensibilitat, mentre que la de 2 mM escurça el temps d'anàlisi. Altres autors, amb altres fases mòbils, també han arribat a la conclusió de que una disminució de concentració millora la sensibilitat però augmenta el temps de retenció (109,159,160).

Influència de la concentració de la espècie absorbent en la fase mòbil sobre la longitud d'ona

Durant la selecció de les condicions cromatogràfiques per a les proves exploratòries (apartat 5.4.2), es va comprovar que la fase mòbil inicial de 2mM de biftalat 6% (v/v) d'acetonitril i pH 5,0 obligava a capturar el cromatograma a longituds d'ona superiors a 254 nm per apreciar els pics dels analits.

També s'ha estudiat la relació entre la concentració de l'electròlit cromòfor i la longitud d'ona per a les fases mòbils que han permès la separació dels set anions. Per a tal fi, es van adquirir cromatogrames a diferents longituds d'ona. Es mostren els resultats a 250 nm (Fig. 29 i Fig. 30).

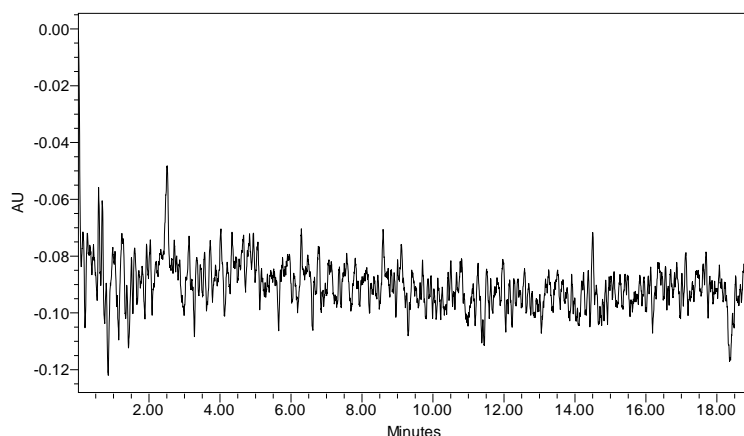


Fig. 29. Cromatograma capturat a 250 nm d'una solució patró de 7 anions a 40 mg/L amb l'eluent 2mM en ftalat àcid de potassi

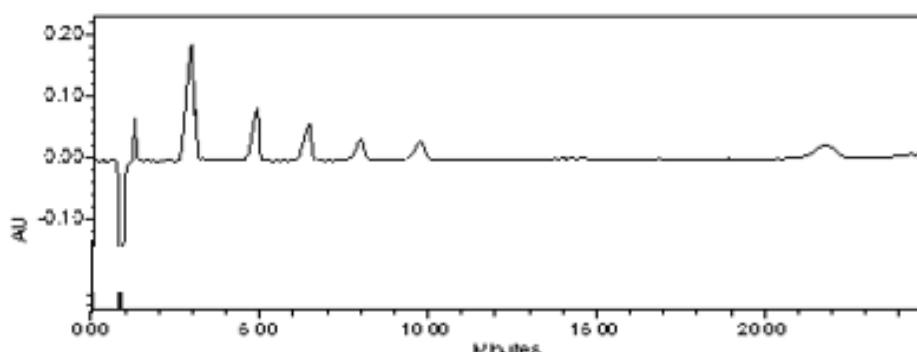


Fig. 30. Cromatograma capturat a 250 nm d'una solució patró de 7 anions a 40 mg/L amb l'eluent 1mM en ftalat àcid de potassi

S'aprecia com la fase mòbil 2mM en biftalat potàssic a 250 nm (Fig. 29) produeix molt soroll i impossibilita la distinció dels pics dels ions. A la pràctica, s'ha comprovat que cal treballar a 260 nm amb aquesta concentració.

L'eluent 1mM admet longituds d'ona inferiors perquè presenta menor absorbància en l'UV; s'obtenen pics distingibles del soroll a longituds d'ona superiors a 245 nm. Una disminució de la concentració de biftalat disminueix l'absorbància de l'eluent i l'ús d'una longitud d'ona menor sense saturació del detector.

Influència del volum d'injecció

Per comprovar l'efecte del volum injectat, es van construir rectes de calibratge per a tots els anions a diferents volums d'injecció i amb dues fases mòbils: 2mM en biftalat potàssic amb 8 % d'acetonitril a pH final 6,5 i 1 mM en biftalat potàssic amb 8% d'acetonitril a pH final 6,2.

En totes les rectes es van emprar patrons de concentracions 5, 10, 20, 30 i 40 ppm. Els volums assajats van ser 5, 10, 20 i 40 µL. No es van observar diferències en quant a la qualitat dels pics i de les rectes de calibratge.

Davant el dubte referent al volum a injectar, es va consultar al departament tècnic del fabricant de la columna sobre el volum màxim permès. Els tècnics comentaren que la configuració del cromatògraf emprat permet un volum màxim de 100 µL, tot i que amb canvis en el "loop" i en la xeringa és possible injectar fins a 1 mL. També van indicar que és la columna qui realment limita el volum d'injecció: com a recomanació, no injectar més d'un 5% del volum del cilindre de la columna. En qualsevol cas, aconsellen fer proves amb increments successius de volums i si el cromatograma no es deforma ni perd resolució, poden injectar-se volums superiors de mostra.

El volum de la columna IC-Pak A HR és 1,25 mL, i per tant, el volum màxim recomanat és 62,5 µL (5% de volum de la columna). Això justifica que no s'observessin diferències en les injeccions dels volums assajats, ja que tots els volums estudiats compleixen el límit de capacitat de la columna.

Quan el mètode s'apliqui a mostres reals, es valorarà en cada cas el volum d'injecció més adequat tenint present la concentració aniònica a determinar i el valor màxim a injectar (62,5 µL).

5.4.7. Condicions cromatogràfiques proposades

Els resultats obtinguts en els apartats anteriors permeten definir les millors condicions per a la determinació simultània dels set anions inorgànics.

Es proposen dos fases mòbils, depenent de la necessitat de prioritzar menor temps d'anàlisi o major sensibilitat (Taula 17).

Temperatura de la columna	30 ± 1° C
Fase mòbil	Menor temps (Tr sulfat: 8 minuts) 2mM en biftalat potàssic i 8 % d'acetonitril a pH final 6,5±0,2
	Major sensibilitat (Tr sulfat: 15 minuts) 1mM en biftalat potàssic i 8% d'acetonitril a pH final 6,2±0,2
Longitud d'ona	260nm
Volum d'injecció	20 µL (tot i que en mostres reals podrien injectar-se volums compresos entre 5 i 62,5 µL)
Flux	0,9 mL/minut

Taula 17. Resum de les condicions òptimes proposades en la detecció indirecta d'anions per CI

5.4.8. Temps de retenció dels anions inorgànics (detecció indirecta)

La Taula 18 recull els temps de retenció obtinguts amb patrons dels anions inorgànics estudiats, amb les dos opcions de fases mòbils proposades a la Taula 17. Tot i així, en futures determinacions amb mostres reals, es recomana injectar sempre patrons de control per confirmar la identitat dels pics.

Anió	Temps de retenció orientatius amb detecció indirecta			
	Eluent 2mM en biftalat potàssic i 8 % d'acetonitril a pH final 6,5		Eluent 1mM en biftalat potàssic i 8% d'acetonitril a pH final 6,2	
	Tr (minuts)	± s (desviació estàndard en minuts)	Tr (minuts)	± s (desviació estàndard en minuts)
Fluorur	1,86	0,005	2,57	0,001
Fosfat	2,42	0,001	3,20	0,001
Clorur	3,12	0,005	4,22	0,011
Nitrit	4,50	0,059	5,60	0,004
Bromur	5,01	0,008	7,14	0,005
Nitrat	6,12	0,006	8,61	0,012
Sulfat	7,27	0,032	15,3	0,017

Taula 18. Temps de retenció dels anions amb fases mòbil biftalat de potassi a diferents concentracions (condicions cromatogràfiques de la Taula 17)


5.4.9. Viabilitat de la determinació d'anions orgànics amb detecció UV indirecta


S'estudia la viabilitat de l'aplicació de les condicions cromatogràfiques que han funcionat en la separació dels anions inorgànics a la determinació dels anions orgànics d'interès en el sector (formiat, acetat, lactat i oxalat).

La possibilitat de quantificar els àcids fòrmics comercials per cromatografia iònica suposaria un gran avenç. Actualment l'anàlisi del contingut d'àcid fòrmic en mostres comercials es realitza volumètricament i proporciona l'acidesa total. La cromatografia de gasos amb el detector FID tampoc permet l'anàlisi d'àcid fòrmic. El detector de masses, en cromatografia de gasos, sí ho permet, però actualment es tracta d'un sistema de detecció inaccessible econòmicament per a molts laboratoris. Per tant, seria una novetat important disposar d'una tècnica analítica simple, tal com la CI amb detecció UV, per quantificar selectivament el formiat en mostres d'àcid fòrmic comercial.

La literatura indica la dificultat de determinar simultàniament anions orgànics i inorgànics per CI (95). Actualment existeix al mercat una ampla gama de columnes de separació específiques per a l'anàlisi de diferents anions en matrius de complexitat diversa. Atès que en aquesta tesi s'ha volgut optimitzar al màxim els recursos disponibles en un laboratori del sector adober, s'ha treballat sempre amb la mateixa columna, la IC-Pak A HR. Aquesta columna és recomanada per separar i quantificar anions inorgànics, tals com fluorur, clorur, nitrit, bromur, nitrat, fosfat i sulfat; tot i així, s'ha volgut valorar la seva eficàcia en la determinació d'anions orgànics típics en la indústria de la pell, i emprant la detecció indirecta.

Es van preparar patrons individuals de l'ordre de 40 mg/L dels anions **formiat, lactat, acetat i oxalat** i es van injectar per duplicat utilitzant la fase mòbil 1mM en biftalat (8%ACN i pH 6,2) en les condicions de l'apartat 5.4.8. Es va observar coincidència entre els temps de retenció del lactat i de l'acetat. D'altra banda, es van comparar els temps de retenció dels anions orgànics i inorgànics en les mateixes condicions, observant-se solapament de formiat amb fosfat i de fluorur amb lactat i acetat. Un fet positiu és que no hi ha interferències entre formiat, l'anió orgànic més àmpliament utilitzat en adoberia, i les altres espècies orgàniques assajades (acetat i lactat). La Taula 19 reflecteix els resultats.

Temps de retenció (minuts) Fase mòbil 1mM en biftalat (8 % ACN i pH 6,2)		
Fluorur 2,51	Fosfat 3,21	Oxalat 18,44
Lactat 2,51	Formiat 3,11	
Acetat 2,64	 Solapament	



Solapament

Taula 19. Comparativa del temps de retenció d'alguns anions orgànics i inorgànics

No s'ha aprofundit en la recerca d'un procediment amb detecció indirecta per diferenciar lactat, fluorur i acetat perquè no és habitual que aquests anions es trobin conjuntament en una mateixa mostra, tal i com es va comprovar en l'anàlisi de diferents mostres de pells (Capítol 6). En tot moment cal recordar que s'està treballant amb una columna cromatogràfica ideada per a la separació d'anions inorgànics.

La determinació d'anions com lactat, succinat, tartrat, oxalat, i altres, que poden ser indicadors químics rellevants en indústries alimentàries (vi, llet, cereals, cervesa...) queden fora de l'abast de la tesi i serien objecte d'un altre estudi.

La quantificació de l'anió formiat per detecció indirecta suposa un inconvenient en mostres que continguin també fosfat (solapament dels pics de formiat i fosfat, mateix temps de retenció). L'anàlisi del formiat també s'ha estudiat en la línia d'investigació amb detecció directa (apartat 5.5.5) i en l'apartat 6.5.3 es presenta el protocol que s'ha dissenyat en la determinació d'anions en pells per resoldre la dificultat de quantificar fosfat i formiat quan es troben presents en una mateixa mostra. Aquest procediment combina la cromatografia iònica amb detecció directa i indirecta i la fotolorimetria.

5.4.10. Linealitat dels calibratges

Es van preparar patrons de fosfat, formiat, fluorur, clorur, bromur, nitrat i sulfat en intervals compresos entre 5,00 i 100 mg/L a partir de patrons multielements de 1000 mg/L. Es van construir les corresponents rectes de calibratge per a tots els anions. En tots els casos es van emprar 5 patrons i es van injectar per duplicat emprant les condicions cromatogràfiques de la Taula 17 (ambdues fases mòbils). Es va comprovar la bona linealitat de totes les rectes a través del coeficient de correlació (r) i del contrast F de l'anàlisi ANOVA. S'han obtingut valors de $r > 0,999$ i s'ha verificat que en tots els casos $F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$ (Taula 20 i Taula 21).

Detecció indirecta, fase mòbil biftalat potàssic 1 mM				
Analit	Rang (mg/L)	Equació calibratge	Coeficient de correlació (r)	ANOVA (Contrast F)
Formiat	5,00-100	$y=13545x-7453,1$	0,9999	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$
Fosfat	5,00-40,0	$y = 6628,9x + 1411$	0,9999	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$
Clorur	5,00-100	$y=17336x+22681$	0,9997	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$
Bromur	5,00-40,0	$y=7928,5x-3914,8$	0,9999	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$
Nitrat	5,00-40,0	$y=10345x-7776,7$	0,9998	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$
Sulfat	5,00-100	$y=11899x+4302,7$	0,9999	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$

Taula 20. Rectes de calibratge, detecció indirecta. Fase mòbil: 1 mM en Biftalat potàssic, 8% (V/V) ACN, pH $6,2 \pm 0,2$. Volum injectat 20 μL . Longitud d'ona 260 nm

Detecció indirecta, fase mòbil biftalat potàssic 2 mM				
Analit	Rang (mg/L)	Equació calibratge	Coeficient de correlació (r)	ANOVA (Contrast F)
Fosfat	5,00-40,0	$y = 6536,4x + 1637,1$	0,9996	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$
Clorur	5,00-100	$y=16902x-13285$	0,9999	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$
Bromur	5,00-40,0	$y=7052,6-6629,8$	0,9999	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$
Nitrat	5,00-40,0	$y=9661x-22327$	0,9998	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$
Sulfat	5,00-100	$y=11029x+1101,5$	0,9996	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$

Taula 21. Rectes de calibratge, detecció indirecta. Fase mòbil: 2 mM en Biftalat potàssic, 8% (V/V) ACN, pH $6,5 \pm 0,2$. Volum injectat 20 μL . Longitud d'ona 260 nm

5.4.11. Conclusions de l'estudi amb detecció indirecta

En cada un dels apartats anteriors, referents a les diferents etapes de l'experimentació, ja s'ha realitzat la discussió amb detall dels resultats. Es presenta, a continuació, un resum de les conclusions generals de la vessant d'investigació centrada en el desenvolupament de metodologia per a determinar anions amb detecció indirecta:

- Es demostra la possibilitat d'analitzar simultàniament anions inorgànics absorbents i no absorbents en l'ultraviolat mitjançant cromatografia iònica amb detecció UV indirecta amb un temps d'anàlisi raonable i amb una resolució superior a 1,5 entre tots els pics.
- El rang de temperatures assajades no va afectar el temps de retenció, tot i així, es va optar per la temperatura de 30°C perquè és més fàcil reproduir-la en les diferents èpoques de l'any. (El cromatògraf disposa de forn amb sistema de calefacció però no de refrigeració i temperatures de treball inferiors podrien requerir refrigeració en èpoques d'estiu).
- L'interval estudiat de valors de contingut d'acetonitril en la fase mòbil va produir poques diferències en els paràmetres analitzats: temps de retenció, nombre de plats teòrics i resolució. Es recomana un 8% d'acetonitril per aconseguir menor temps d'anàlisi, protecció microbiana i cost econòmic raonable.
- El pH és el factor determinant per aconseguir separar amb eficàcia els anions i disminuir el temps de retenció. Valors de pH compresos entre 6,2 i 6,5 permeten determinar simultàniament els 7 anions amb resolucions superiors a 1,5 entre tots els parells de pics.
- La concentració de l'espècie absorbent afecta la detecció i el temps de retenció. Una disminució de la concentració de biftalat disminueix l'absorbància de l'eluent i permet l'ús d'una longitud d'ona menor sense saturació del detector; també millora la sensibilitat, però augmenta el temps de retenció.
- Es recomanen volums d'injecció compresos entre 5 i 62,5 µL.
- Els eluents proposats per separar els set analits inorgànics són:
 - a) 2 mM en biftalat potàssic a valors d'acetonitril compresos entre 6-10% i pH final $6,5 \pm 0,2$.
 - b) 1 mM en biftalat potàssic a valors d'acetonitril de l'ordre 6-10% i pH final $6,2 \pm 0,2$.

- En les aplicacions a mostres reals dels capítols posteriors, es triarà la fase mòbil en funció de la necessitat de prioritzar menor temps d'anàlisi o màxima sensibilitat:
 - ✓ Per a mostres amb baixes concentracions d'anions es recomana la fase mòbil 1 mM de ftalat àcid de potassi i 8 % d'acetonitril a un pH 6,2 (major sensibilitat).
 - ✓ Per a l'anàlisi d'un elevat volum de mostres on es valora la rapidesa de l'anàlisi s'aconsella la fase mòbil 2 mM de ftalat àcid de potassi i % d'acetonitril entre 8 i 10 a un pH final de 6,5.
- L'anió format també pot determinar-se amb les condicions cromatogràfiques proposades quan la mostra no contingui fosfat. La determinació de format en presència de fosfat s'ha estudiat en el Capítol 6, on es presenta el protocol que permet l'anàlisi dels dos anions.
- S'ha demostrat la bondat de les rectes de calibratge per als anions estudiats en l'interval de concentracions de 5,00 fins a 100 mg/L.

En els capítols 6 i 7 s'aplica amb èxit la metodologia desenvolupada a diferents mostres reals.

Es recomana, per a futurs estudis de recerca que quedarien fora de l'abast d'aquesta tesi, l'ampliació de la metodologia desenvolupada a la determinació d'anions com lactat, succinat, tartrat, oxalat, i altres, que poden ser indicadors químics rellevants en indústries alimentàries (vi, llet, cereals, cervesa...).

5.5. Metodologia amb CI i detecció UV directa

5.5.1. Introducció i objectius

Aquesta vessant de l'estudi, amb detecció directa, té com a **objectiu principal** desenvolupar metodologia per analitzar anions absorbents d'interès en adoberia, en el rang de l'UV. Els anions que s'assagen són nitrat, nitrit, acetat i formiat. Tot i que el formiat i l'acetat presenten una feble absorció en l'UV, s'investigarà la possibilitat d'analitzar-los aprofitant la característica del detector PDA que registra contínuament els espectres dels analits i els compara amb els dels patrons de la llibreria. A l'apartat 5.4.9 ja s'ha explicat la importància de disposar de metodologia per quantificar el formiat en mostres d'àcids fòrmics comercials concentrats. El procediment volumètric emprat fins ara determina l'acidesa total.

Es comparen dues fases mòbils, borat-gluconat i sulfat sòdic. La primera és la fase mòbil estàndard (102), la més recomanada a la bibliografia, i la segona és una novetat proposada en aquest projecte. A l'apartat 5.5.2 es raona amb detall la selecció d'aquests dos eluents. Es decideix assajar el sulfat sòdic després d'observar la impossibilitat de detectar els analits acetat i formiat amb la fase borat-gluconat.

Es proposa un nou mètode amb sulfat sòdic com a fase mòbil que s'aplicarà a diverses mostres d'àcids fòrmics comercials, aigües d'interès ambiental, pells i mostres d'altres sectors (capítols 6 i 7).

Per assolir l'objectiu principal, es plantegen el següents **objectius específics**:

- Seleccionar les fases mòbils adequades en l'anàlisi dels ions d'interès en adoberia.
- Avaluar la idoneïtat dels eluents seleccionats.
- Comprovar la linealitat de les rectes de calibratge

5.5.2. Selecció de les fases mòbils

Els principals eluents trobats en la literatura per determinar anions mitjançant cromatografia iònica i detecció ultraviolada directa són borat-gluconat i carbonat-bicarbonat (95,102,152) (veure apartat 3.7.1).

En aquest estudi s'ha decidit avaluar dos fases mòbils: borat-gluconat i sulfat sòdic. A continuació es justifica aquesta elecció:

- L'eluent borat-gluconat és el recomanat pel fabricant de la columna cromatogràfica per a l'anàlisi d'anions inorgànics (152).
- No s'estudia la fase carbonat/bicarbonat sòdic (102) per tractar-se d'un eluent alcalí que podria provocar problemes de carbonatació en la columna iònica emprada. Les limitacions de la columna s'han descrit al punt 5.4.2 (durant l'elecció de la fase mòbil amb detecció indirecta).
- Respecte al sulfat sòdic, no s'ha trobat cap publicació que empri aquesta substància com a fase mòbil en cromatografia iònica. Es coneix que ha proporcionat bons resultats en electroforesi capil·lar (25,160) i, ja que és un reactiu econòmic, insensible al CO₂ atmosfèric i habitual en qualsevol laboratori, s'ha optat per investigar-lo com a eluent.

5.5.3. Avaluació de la fase mòbil borat-gluconat

Les condicions cromatogràfiques emprades amb l'eluent borat-gluconat, (Taula 22), són una adaptació de les condicions que apareixen en la bibliografia (102).

Fase mòbil	Borat de liti i gluconat de liti amb un 12% d'acetonitril, preparada segons el manual d'especificacions de la columna IC-Pak (152) (veure la preparació a l'apartat 5.2)
Temperatura	30 ± 1° C
Longitud d'ona	210 nm
Volum injecció	15 µL
Flux	0,9 mL/minut

Taula 22. Condicions cromatogràfiques amb la fase mòbil borat- gluconat

Es van injectar per duplicat patrons individuals de nitrat, nitrit, acetat i formiat a diferents concentracions. En els cromatogrames no es van detectar els analits acetat i formiat. Les figures Fig. 31 i Fig. 32 mostren cromatogrames típics d'un patró de nitrat i nitrit respectivament. Aquests dos anions es van separar amb una resolució superior a 1,5 (calculada segons la fórmula de la Fig. 26).

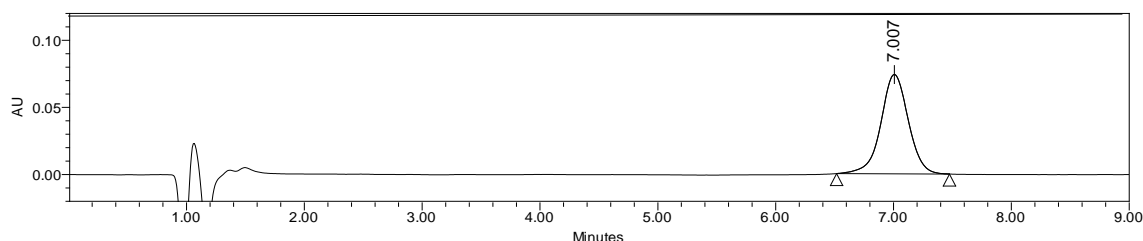


Fig. 31. Cromatograma obtingut amb el patró de 10 ppm de Nitrat (15 μ L, 210 nm, 30 $^{\circ}$ C i fase mòbil borat-gluconat)

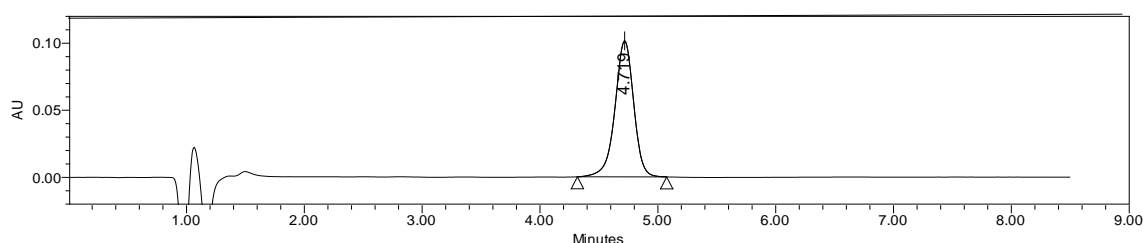


Fig. 32. Cromatograma obtingut amb el patró de 10 ppm de Nitrit (15 μ L, 210 nm, 30 $^{\circ}$ C i fase mòbil borat-gluconat)

També es van recuperar els cromatogrames a 202 nm (zona de màxima absorció del formiat i de l'acetat), però l'excés de soroll impossibilitava l'apreciació dels pics dels analits.

Les proves realitzades amb l'eluent borat-gluconat permeten concloure:

- És de laboriosa preparació.
- Cal treballar per sobre de 200 nm. A valors de longitud d'ona inferiors a 200 nm la fase mòbil absorbeix, i s'obtenen cromatogrames amb molt soroll.
- És adequat per a la separació de nitrats i nitrits. Resol els dos components amb eficiència, amb un temps de retenció de 7,0 minuts per al nitrat i de 4,7 minuts per al nitrit amb una resolució superior a 1,5 entre els dos pics.
- No permet identificar anions orgànics com formiat o acetat, que tenen baixa absorptivitat. És per això que es decideix buscar una alternativa i es valorarà la idoneïtat del sulfat sòdic com a fase mòbil (apartat 5.5.5).

5.5.4. Linealitat de les rectes de calibratge per a la quantificació de nitrat i nitrit amb l'eluent borat-gluconat

Es va comprovar la linealitat de les rectes de calibratge per als anions nitrat i nitrit en les condicions de la Taula 22. En cada cas es van injectar, sempre per duplicat, 5 patrons en l'interval de 0,50 a 26 ppm. Aquest rang es va deduir experimentalment. Interessaven pics amb àrees superiors a 15000 perquè el soroll no afectés i així aconseguir una òptima integració. Es va verificar que una concentració mínima de 0,50 ppm, tant en el cas dels nitrats com dels nitrits, proporciona una àrea adequada. La linealitat es va estudiar en un rang de 50 vegades la concentració del patró més diluït. Les dades de les rectes de calibratge es recullen a la Taula 23.

Calibratges amb detecció directa, fase mòbil borat/gluconat				
Analit	Rang (mg/L)	Equació calibratge	Coefficient de correlació (r)	ANOVA (Contrast F)
Nitrat	0,50-25,0	$y=120511x-11675$	0,9999	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$
Nitrit	0,50-25,0	$y = 109062x - 8295,4$	1,000	$F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$

Taula 23. Dades de les rectes de calibratge dels anions nitrat i nitrit (15µL, 210 nm, 30 °C i fase mòbil borat-gluconat)

El mètode resulta lineal en l'interval de concentracions assajat, tant per a la quantificació del nitrat com per la del nitrit. Els coeficients de correlació per a les rectes de cada anió són superiors a 0,9999 i l'anàlisi ANOVA proporciona en tots els casos valors de $F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$.

5.5.5. Avaluació d'una nova fase mòbil, el sulfat sòdic

En l'apartat 5.5.3 s'ha vist que la fase mòbil borat/gluconat no permet la detecció dels anions acetat i formiat. Per aquest motiu es va decidir investigar el comportament de l'eluent sulfat sòdic. La selecció d'aquesta nova fase mòbil s'ha justificat en el punt 5.5.2. Les instruccions per a la seva preparació es troben a l'apartat 5.2.

Es van injectar patrons individuals de nitrat, nitrit, bromur, formiat i acetat a concentracions aproximades de 40 ppm amb l'objectiu valorar les possibilitats que ofereix el sulfat sòdic com a eluent en cromatografia iònica. L'ús d'aquesta fase mòbil en cromatografia és una de les novetats d'aquest treball, i per tant, no existeix literatura per consultar les condicions cromatogràfiques.

L'experiència assolida fins ara en CI va possibilitar fixar les condicions de l'estudi (Taula 24). En el cas dels anions orgànics es va comprovar que a 202 nm s'obtenien àrees superiors i per tant, millorava la sensibilitat. També es va determinar el LOD, aplicant la fórmula de l'apartat 4.3.3, per a l'anió formiat a 202 i a 210 nm i es va constatar que s'obtenia un millor valor per a aquest paràmetre a 202 nm (0,5 mg/L front el valor de 1,1 mg/L obtingut a 210 nm).

Fase mòbil 1 mM en sulfat sòdic, 8 % d'acetonitril, pH final 6, $8 \pm 0,2$	
Temperatura	30 °C
Longitud d'ona	210 nm per anions nitrat i nitrit 202 nm pels anions acetat i formiat
Volum injecció	15 - 20 µL
Flux	0,9 mL/minut

Taula 24. Condicions cromatogràfiques amb la fase mòbil sulfat sòdic

Els analits es van separa adequadament i amb una resolució superior a 1,5 (calculada segons la fórmula de la Fig. 26).

Els temps de retenció per a cada anió es mostren a la Taula 25.

Analit	Temps de retenció en minuts
Nitrat	14,33
Bromur	11,32
Nitrit	8,323
Formiat	4,049
Acetat	3,144

Taula 25. Temps de retenció en les condicions de la Taula 24

Les injeccions amb la nova fase mòbil proposada permeten concloure:

- L'eluent sulfat sòdic separa els anions estudiats (nitrat, nitrit, formiat i acetat) amb una resolució superior a 1,5. Es recorda que la fase mòbil borat-gluconat no permet la identificació dels dos analits orgànics.
- El formiat i l'acetat presenten menor sensibilitat que el nitrat i nitrit (a igual concentració s'obtenen àrees inferiors en els pics dels ions orgànics). Aquest fet concorda amb les dades espectrals obtingudes en l'apartat 5.3 (Fig. 13 i Annex 1) que mostren que els anions formiat i acetat són poc absorbents. Es comprova que a 202 nm millora la sensibilitat del formiat.

També s'han comparat els preus dels eluents sulfat sòdic i borat-gluconat. Sense considerar l'acetonitril, el cost econòmic de 10 L de sulfat sòdic 1 mM és de 3 cèntims, mentre que el mateix volum de la fase mòbil borat-gluconat suposa una despesa de 10 euros. El sulfat sòdic es mostra més econòmic.

5.5.6. Linealitats de les rectes de calibratge amb la fase mòbil sulfat sòdic

Es comproven les linealitats per als anions nitrat, nitrit, acetat i formiat mitjançant la construcció de les corresponents rectes de calibratge a les condicions de la Taula 24. Les dades de l'estudi de linealitat es troben a la Taula 26. En el cas dels analits orgànics s'assagen dues longituds d'ona per permetre escollir entre dos valors de sensibilitat (202 i 210 nm).

Calibratges amb detecció directa, fase mòbil: 1 mM en sulfato sòdic						
Analit	Rang (mg/L)	Longitud d'ona (nm)	Volum Injecció (μL)	Equació calibratge	Coefficient de correlació (r)	ANOVA (Contrast F)
Formiat	5,00-100	202	20	$y=2026,1x-904,17$	0,9999	$F_{exp} > F_{taules}$
Formiat	5,00-40,0	202	20	$y=2163,5x-749,6$	0,9999	$F_{exp} > F_{taules}$
Formiat	5,00-40,0	210	20	$y = 1384,3x-939,83$	0,9999	$F_{exp} > F_{taules}$
Acetat	2,00-30,0	202	20	$y=831,68x + 428,21$	0,9999	$F_{exp} > F_{taules}$
Acetat	2,00-30,0	210	20	$y=812,34x-200,53$	0,9997	$F_{exp} > F_{taules}$
Nitrat	5,00-40,0	210	20	$y=169623x-49674$	0,9999	$F_{exp} > F_{taules}$
Nitrat	0,50 – 25,0	210	15	$y = 122021x - 6846,4$	0,9999	$F_{exp} > F_{taules}$
Nitrit	0,50 – 25,0	210	15	$y= 113186x - 10757$	1,000	$F_{exp} > F_{taules}$

Taula 26. Rectes de calibratge detecció directa. Fase mòbil: 1mM en sulfato sòdic, 8% (V/V) ACN i pH final 6,8 ± 0,2

Els resultats indiquen que:

- El sulfat sòdic esdevé un eluent econòmic adequat per a la quantificació dels anions assajats, tant orgànics com inorgànics.
- Els coeficients de correlació de totes rectes de regressió calculades són superiors a 0,9997.
- Per l'anió formiat la sensibilitat a 202 nm és 1,6 vegades superiors que a 210. (En l'interval lineal d'un mètode, la pendent de la recta correspon a la sensibilitat de la recta de calibratge. A major pendent, més sensibilitat).
- Per l'anió acetat la sensibilitat obtinguda a les dues longituds d'ona és similar.

5.5.7. Comparació de les linealitats obtingudes amb els dos eluents assajats (borat-gluconat i sulfat sòdic)

Es representen les rectes de calibratge per l'anió nitrat obtingudes amb les dues fases mòbils estudiades, borat liti/gluconat de liti amb 12% acetonitril i 1mM sulfat sòdic amb 8% acetonitril i pH final 6,8 (Fig. 33). En tots els casos s'han injectat 15 μ L a 30°C i la longitud d'ona de treball ha estat 210 nm.

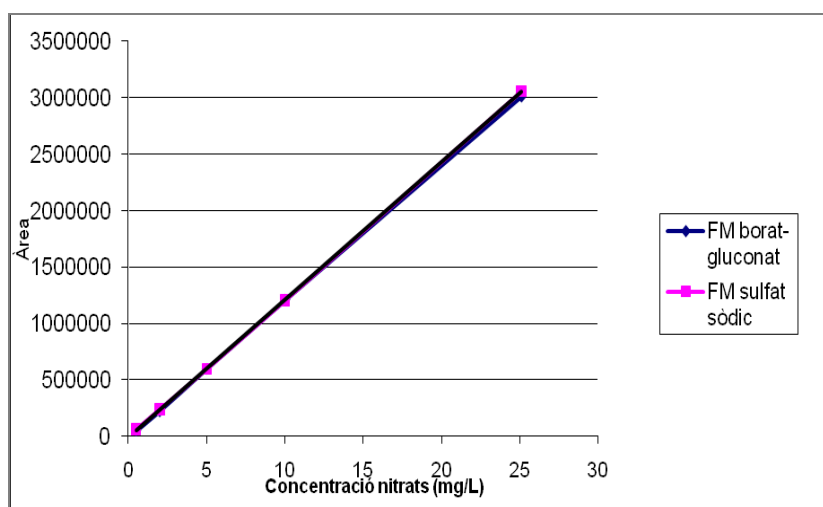


Fig. 33. Comparativa de les rectes de calibratge per l'anió nitrat amb les fases mòbils sulfat sòdic i borat gluconat

S'evidencia la superposició de les dues rectes. Presenten pendents similars, fet que indica que els dos mètodes proporcionen la mateixa sensibilitat de calibratge. Per a l'anió nitrit s'obtenen les mateixes conclusions que en el cas del nitrat.

5.5.8. Robustesa del nou mètode amb sulfat sòdic enfront al pH de la fase mòbil

Es va estudiar la robustesa del nou mètode amb sulfat sòdic respecte al pH de la fase mòbil amb l'objectiu de determinar l'efecte de variacions de pH en la quantificació dels analits nitrat, nitrit, acetat i formiat.

El pH és un paràmetre crític bàsicament per dos motius:

- S'ha comprovat que una de les dificultats trobades durant la preparació de l'eluent és aconseguir ajustar el pH final sempre al mateix valor exacte.
- El pH de la fase mòbil és un dels factors que més afecta el resultat en cromatografia iònica, com s'ha explicat al punt 3.5 i s'ha pogut verificat en l'apartat 5.4.6, en l'estudi de detecció indirecta.

La literatura recomana incloure l'avaluació de la robustesa en el desenvolupament d'un mètode i no en la validació pròpiament dita. Si la robustesa no s'estudia amb anterioritat a la validació, pot succeir que s'intenti validar un mètode poc robust, amb els conseqüents resultats inadequats i pèrdues de temps i econòmiques. La forma més eficaç d'estudiar la robustesa és mitjançant un disseny factorial (130).

En aquest cas s'opta per un disseny factorial complet 2^2 . S'estudien dos valors de pH de la fase mòbil (6,74 i 8,24) a dos longituds d'ona diferents (202 i 210 nm). Es construeixen rectes de calibratge per a cada anió a diferents valors de pH de l'eluent i a dues longituds d'ona i es comparen les sensibilitats obtingudes. Per l'interval lineal d'un mètode, la pendent correspon a la sensibilitat de la recta de calibratge, i és un paràmetre objecte de seguiment en calibratges rutinaris (104).

Les condicions cromatogràfiques comunes a totes les injeccions són:

- Fase mòbil 1mM en sulfat sòdic, 8 % d'acetonitril, pH final ajustat amb KOH 0,5 M.
- Temperatura de la columna 30°C.
- Volum d'injecció: 15 μ L pels ions nitrat i nitrit i 20 μ L pel formiat i l'acetat.

Els resultats de les rectes de calibratge obtingudes per a cada anió es recullen a l'Annex 2. Com a exemple, la Fig. 34 compara les rectes de calibratge a diferents valors de pH per a l'anió formiat a 210 nm.

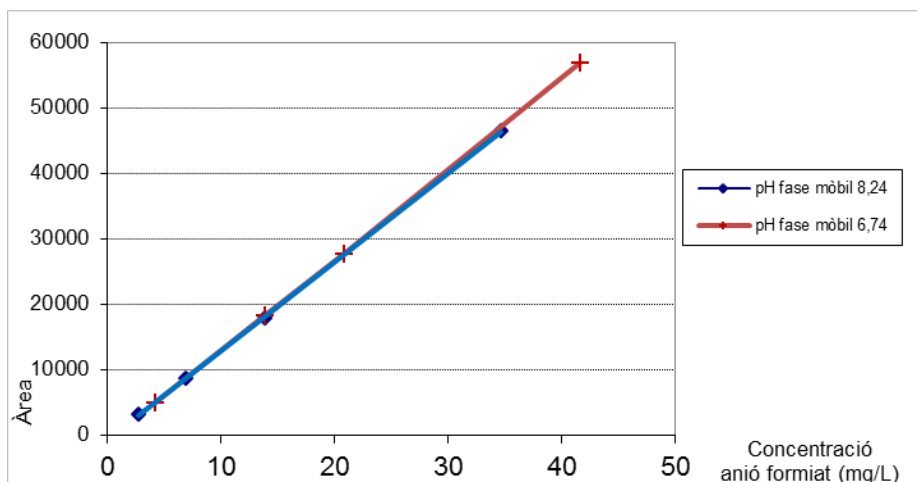


Fig. 34. Rectes de calibratge obtingudes per a l'anió format a 210 nm a dos valors de pH diferents (8,24 i 6,74)

S'evidencia que en els analits estudiats i en l'interval de concentració seleccionat, variacions de pH de la fase mòbil entre 6,8-8,2 no produeixen canvis substancials en les rectes de calibratge. Les diferents rectes per a cada anió presenten similars pendents a una mateixa longitud d'ona. L'avaluació estadística de les dades obtingudes amb el programa StathGrafics es pot consultar a l'Annex 2 i recolza les conclusions extretes mitjançant la inspecció visual dels gràfics. Es determina estadísticament, a un nivell de confiança del 95 %, que el factor pH no afecta significativament la sensibilitat del calibratges (p-value superior a 0,05). El nou mètode es presenta robust enfront el pH en les quantificacions dels analits estudiats.

5.5.9. Conclusions de l'estudi amb detecció directa

Les principals conclusions d'aquest estudi son:

- La fase mòbil borat-gluconat permet quantificar nitrat i nitrit, però no detecta els anions orgànics formiat i acetat.
- Es proposa un nou mètode, amb sulfat sòdic com a eluent, que permet detectar i quantificar els quatre analits estudiats: nitrat, nitrit, formiat i acetat amb una resolució superior a 1,5. També detecta el bromur.
- El mètode amb l'eluent sulfat sòdic és robust i el temps d'anàlisi és adequat.
- S'obtenen bones linealitats en les rectes de calibratge obtingudes amb els dos eluents assajats.
- La fase mòbil de sulfat sòdic proporciona la mateixa sensibilitat de calibratge, en el cas de nitrats i nitrats, que la fase mòbil borat-gluconat.
- El sulfat sòdic es presenta com a eluent més econòmic i de més fàcil preparació.
- L'eluent borat-gluconat resol el nitrat i el nitrit a temps de retenció inferiors que el sulfat sòdic.
- En resum, es recomana la utilització de l'eluent sulfat sòdic per a la detecció directa dels anions nitrat, nitrit, bromur, formiat i acetat. L'eluent borat gluconat sols es recomana per estudis en que s'hagi de determinar únicament nitrat i nitrit en un nombre molt elevat de mostres i per tant, l'estalvi en temps de retenció justifiqui el major cost dels reactius i el superior temps de preparació.

En els capítols 6 i 7 s'aplica amb èxit el procediment amb l'eluent sulfat sòdic a diferents mostres d'interès en el sector adober i en d'altres sectors.

5.6. Conclusions generals

En els apartats 5.4.11 i 5.5.9 s'han exposat amb detall les conclusions de les línies d'investigació amb detecció indirecta i directa, respectivament.

S'ha aconseguit desenvolupar mètodes cromatogràfics innovadors, amb detecció UV indirecta i directa, per a la determinació simultània dels principals anions d'interès que contribueixen a la salinitat del sector adober (clorurs, sulfats, nitrats, fosfats, nitrit, formiats i acetats).

En la detecció indirecta s'ha trobat l'inconvenient de no poder detectar formiat i fosfat simultàniament; però aquesta dificultat ha quedat resolta amb la metodologia de detecció directa, que possibilita l'anàlisi de formiat. L'apartat 6.5.3 presenta un protocol per actuar en mostres que continguin fosfat i formiat.

La metodologia desenvolupada s'aplicarà a mostres reals (capítols 6 i 7).



Capítol 6. Aplicació de la cromatografia iònica a la determinació d'anions en pells

6.1. Introducció

Aquest capítol i el següent es centren en l'aplicació de la metodologia de cromatografia iònica, desenvolupada en la secció anterior, a la determinació d'anions en mostres reals del sector adober. A causa de la complexitat de la matriu sòlida pell, s'ha dedicat un capítol exclusiu a aquestes mostres.

En l'apartat 2.3 s'ha explicat la problemàtica que genera un excés d'anions en els cuirs. També s'ha constatat, a través de la revisió bibliogràfica, l'absència de procediments per a la determinació d'aquests analits en les pells.

La metodologia cromatogràfica s'aplica a la determinació dels principals anions responsables de la salinitat en mostres pells (clorur, sulfat i formiat); tot i que també es quantifiquen altres anions presents. Les etapes de l'anàlisi són:

1. Preparació de la mostra
2. Extracció dels anions de la pell
3. Anàlisi cromatogràfica dels anions

La **preparació de la mostra** consisteix en la trituració de la pell en un molí de ganivetes. S'ha realitzat segons el procediment normalitzat descrit a la IUC3 (ISO 4044:2008) (vigent en el moment en què es va dur a terme aquest estudi).

La següent etapa, **l'extracció dels anions** de la pell, és clau per aconseguir la quantificació fiable dels anions. Existeix normativa per a l'extracció de matèries orgàniques i inorgàniques solubles en pell (la norma UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6)), però cal verificar si el procediment normalitzat extreu la totalitat dels anions presents en els cuirs. S'ha dut a terme un estudi per comprovar l'eficàcia de la norma UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6) en l'extracció dels anions de les pells. S'ha valorat com afecten tant la velocitat d'extracció com el nombre d'extraccions al procés extractiu (apartat 6.6).

La **quantificació dels anions** en els extractes de pell s'ha realitzat amb les condicions cromatogràfiques proposades en el capítol anterior per a les fases mòbils biftalat potàssic (detecció indirecta) i sulfat sòdic (detecció directa). S'ha optat per la concentració de biftalat que proporciona més sensibilitat, 1mM.

El procediment amb detecció indirecta permet quantificar de forma ràpida tots els anions de la pell, sempre i quan la mostra no contingui fosfat i/o formiat. En aquests casos hi ha solapament de pics perquè el temps de retenció del formiat i del fosfat coincideixen; aleshores, la confirmació de formiat i/o fosfat requereix de la detecció cromatogràfica directa. Aconseguir la quantificació del formiat i fosfat, emprant una única columna cromatogràfica, ha estat un dels reptes d'aquest capítol. S'ha dissenyat un protocol que resol la dificultat de la interferència fosfat-formiat complementant la cromatografia amb detecció indirecta amb la detecció directa. En algunes pells de composició complexa també s'ha aplicat, com a tècnica complementària, l'espectrofotometria. L'apartat 6.5.3 detalla i justifica el protocol proposat.

6.2. Objectius

L'**objectiu principal** d'aquest capítol és comprovar la viabilitat de la cromatografia iònica amb detecció UV (directa i/o indirecta) en la determinació d'anions en pells.

S'enumeren els **objectius específics**:

- Verificar l'eficiència de de la norma IUC6 (ISO 4098:2006) en l'extracció d'anions de la pell.
- Aplicar la metodologia cromatogràfica desenvolupada en el capítol anterior a la quantificació d'anions com clorur, formiat, fosfat i sulfat en mostres de pell
- Construir rectes de calibratge adequades a l'interval de treball i avaluar la linealitat.
- Dissenyar un protocol vàlid per a les pells que continguin simultàniament formiat i fosfat.
- Explorar els principals paràmetres de validació per demostrar que el procediment cromatogràfic és apte per a l'anàlisi d'anions en pells.

6.3. Materials i reactius

A més dels materials i reactius enumerats en l'apartat 5.2, s'ha emprat:

- Molí de ganivetes de velocitat de rotació $400 \pm 20 \text{ min}^{-1}$ amb un tamís amb perforacions de 3,5-4 mm. Marca Wiley Mill (USA).
- Espectrofotòmetre UV-VIS Lambda 25 (Perkin-Elmer Inc, EE.UU). (Per a la determinació de fosfats en mostres de pell complexes).
- Màquina sacsejadora de vaivé.

6.4. Mostres de pells

Es van analitzar 12 mostres de pells adobades al crom, adobades al vegetal, acabades i sense acabar, com a representació d'algunes de les pells del sector. La descripció i numeració de cada pell es troben a la Taula 27.

Mostres de pell	Descripció
1	Boví crust al crom, color marró
2	Wet-blue de boví
3	Boví vegetal, color natural
4	Serratge afelpat al crom per calçat, marró -vermellós
5	Serratge afelpat al crom, no tenyit
6	Crust vegetal, boví per marroquineria, no tenyit
7	Boví Vegetal, color mostassa, per marroquineria, acabat molt lleuger
8	Boví vegetal per sandàlies sense acabat
9	Pell acabada, boví, per marroquineria (Bosses de luxe), color groc
10	Pell acabada, boví, per marroquineria de luxe, color verd
11	Pell acabada, boví, per carteres de luxe, tenyida color marró
12	Pell acabada, xai, confecció de napa, tenyida color marró grogós

Taula 27. Descripció de les pells analitzades

La nomenclatura utilitzada per identificar les mostres, les rèpliques i el nombre d'extraccions va ser el número de pell seguit d'una lletra per diferenciar les rèpliques (A, B, C...), i per últim un número que informa de quina extracció es tracta (primera, segona....) (Fig. 35).

Significat de la mostra anomenada	1A3
1: Pell 1. Adobada al crom	
A: Rèplica	
3: Tercera extracció consecutiva	

Fig. 35. Exemple de nomenclatura de mostres

6.5. Procediment

6.5.1. Preparació de la mostra

Les mostres de pell assecades a l'aire lliure es van retallar en quadrats d'aproximadament 2x2 cm per a la seva posterior trituració en molí, segons la IUC 3 (ISO 4044:2008) (Fig. 36). S'obtenia pols de pell.



Fig. 36. Molí utilitzat en la preparació de les mostres

6.5.2. Extracció de matèries solubles de la pell

El procediment seguit per a l'extracció de les matèries solubles en la pols de pell ha estat una modificació de la norma UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6). No s'ha realitzat desengreixat previ, s'han conservat les proporcions aigua/pell i s'han modificat les revolucions. L'estudi que es presenta a l'apartat 6.6 va permetre definir el mètode d'extracció proposat. En ell es contempla la possibilitat d'extraccions múltiples per assegurar l'extracció de la màxima concentració aniònica, com es mostra a la Taula 28. També la Fig. 37 esquematitza gràficament el procés de les extraccions consecutives.

Procediment d'extracció adoptat per extreure matèries solubles en la pell

Modificació de la UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6)

1. Pesar 1 g de pols de pell en un porta mostres d'un sol ús de 100mL.



2. Afegir 50 mL d'aigua UP, tapar i agitar mecànicament en una màquina sacsejadora de vaivé a 170 ± 10 rpm durant 2 hores a temperatura entre 20-25 °C



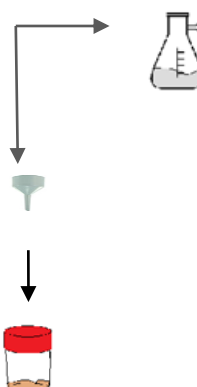
3. Filtrar al buit.

4. Recollir el filtrat (extracte) per a la determinació cromatogràfica posterior (apartat 6.5.3).



5. Conservar el residu de pols de pell per a la següent extracció consecutiva:

- Tara el porta mostres.
- Traspasar quantitativament la pols de pell, amb l'ajut d'una espàtula, des de el paper de filtre al porta mostres.
- Determinar per pesada el pes de la pols de pell (grams de pell humida després de l'extracció)



6. Realitzar la següent extracció consecutiva:

- Afegir, al porta mostres que conté la pols de pell, aigua suficient per completar els 50 mL*.
- Repetir aquest protocol a partir del punt 2.

7. Repetir les extraccions consecutives fins aconseguir un extracte que no proporcioni pics en el cromatograma. Això significava que ja no es poden extreure més anions solubles de la pell.

* Atès que en aquest punt la pols de pell estava humida, no s'afegeixen 50 mL d'aigua, sinó que es calcula, per diferència de pesos, el contingut d'humitat de la pell i s'addiciona la quantitat d'aigua necessària per completar 50 g d'aigua. (Es treballa en massa per minimitzar errors).

Exemple dels càlculs per determinar l'aigua a addicionar a la pols de pell humida d'una primera extracció per tal de dur a terme la segona extracció:

-Grams d'aigua UP a addicionar = $50g_{\text{aigua}} - (g_{\text{pell humida després de l'extracció}} - g_{\text{pell inicial abans de l'extracció}})$

-Dades i càlculs:

-Pes inicial pell seca, abans de la primera extracció: 1,0027g

-Pes pell humida, després de la primera extracció: 2,7687g

Quantitat d'aigua a afegir: $50g_{\text{aigua}} - (2,7687g_{\text{pell humida}} - 1,0027g_{\text{pell}}) = 48,234g_{\text{aigua UP}}$

Taula 28. Proposta de procediment d'extracció de matèries solubles en la pell

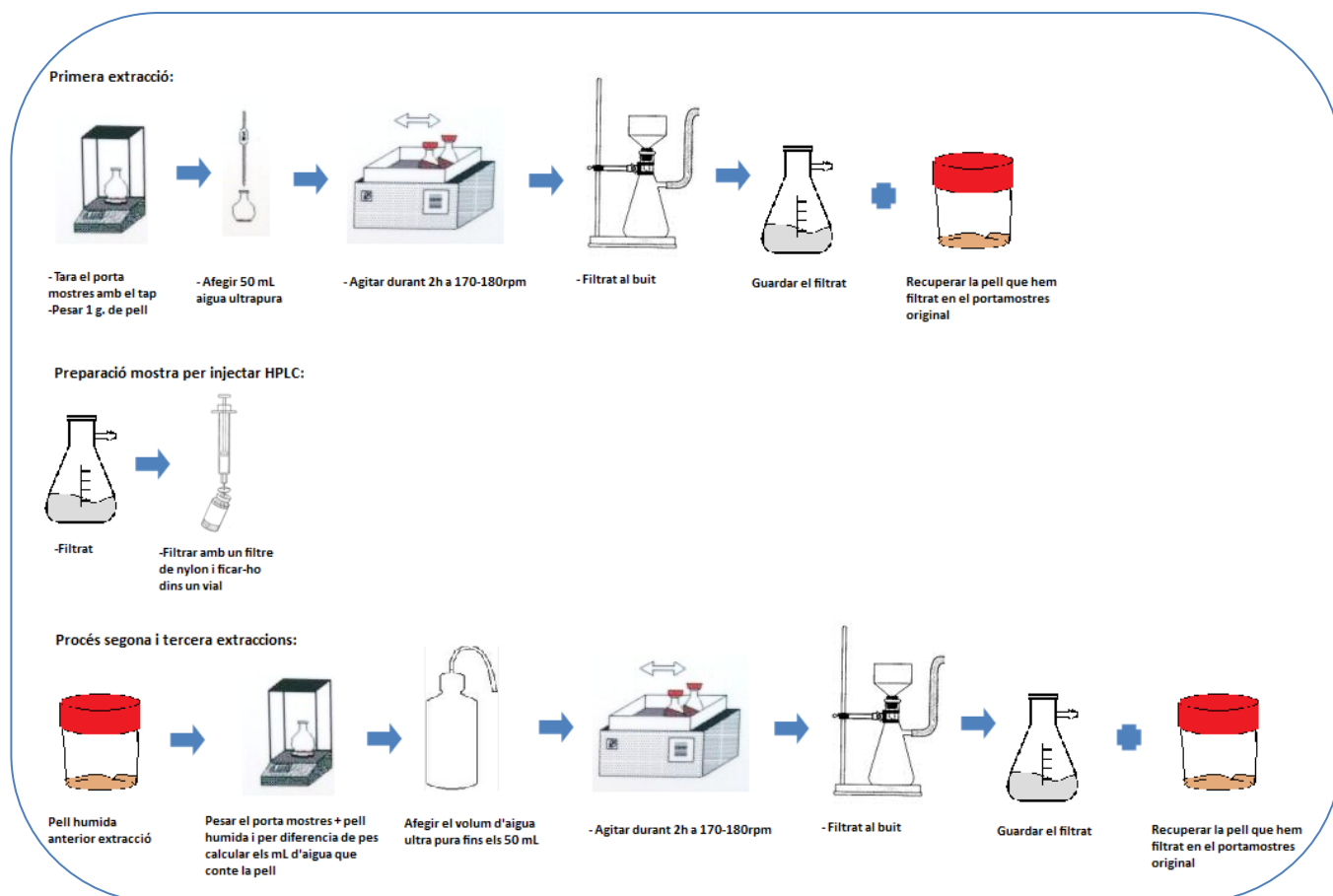


Fig. 37. Esquema extraccions consecutives

6.5.3. Determinació dels anions

En les determinacions cromatogràfiques es filtrava una alíquota de l'extracte amb filtre de xeringa de 0,45 micres i es transferia directament al vial per a l'anàlisi posterior (Fig. 38).



Fig. 38. Filtre de nylon i vial

Font: <http://www.directindustry.es/prod/merck-millipore/product-31514-456844.html>

Les **condicions cromatogràfiques**, justificades en el Capítol 5, van ser les següents:

-Detecció indirecta:

- Fase mòbil: Biftalat potàssic 1mM amb 8% de acetonitril, pH $6,2 \pm 0,2$
- Flux: 0,9 mL/min
- Temperatura: 30 ± 1 °C
- Volum d'injecció: 20 µL
- Detecció: Indirecta amb PDA i recuperació del cromatograma a 260 nm. (Inversió dels pics negatius mitjançant multiplicació pel factor (-1)).

-Detecció directa:

- Fase mòbil: 1mM en sulfat sòdic, 8% (V/V) de acetonitril, pH final $6,8 \pm 0,2$
- Flux: 0,9 mL/min
- Temperatura: 30 ± 1 °C
- Volum d'injecció: 20 µL
- Detecció: Directa con PDA i recuperació del cromatograma a 202 nm pel format i a 210 per la resta d'anions.

En el cas de la detecció indirecta s'ha optat per la fase mòbil de concentració 1mM en biftalat potàssic perquè és la que proporciona cromatogrames amb menys soroll i per tant, pics més fàcils d'integrar.

Les àrees dels analits s'interpolaven en les rectes de calibratge obtingues a les condicions anteriorment esmentades. Aquestes rectes es troben a la Taula 20 i la Taula 26.

Els **temps de retenció** amb els dos sistemes de detecció apareixen a la Taula 29. Aquests valors són orientatius. Poden haver petites diferències amb els temps de retenció presentats en el capítol anterior; aquest fet és normal i és degut a canvis en l'edat de la columna. En totes les sessions de treball s'injectaven patrons de control per verificar la coincidència dels temps de retenció dels analits de les mostres amb els dels patrons. En el cas de la detecció directa, per comprovar l'autenticitat dels anions de la mostra, també es confrontava l'espectre UV/VIS de cada pic detectat amb els espectres estàndards dels patrons emmagatzemats en la llibreria digital.

Anió	Temps de retenció (minuts)	
	Detecció UV indirecta	Detecció UV directa
Formiat	3,0	3,8
Fosfat	3,0	--
Clorur	3,8	--
Nitrat	7,9	13,0
Sulfat	14,0	--

Taula 29. Temps de retenció orientatius

La Fig. 39 i la Fig. 40 corresponen a **cromatogrames de patrons estàndards** amb detecció indirecta i directa respectivament.

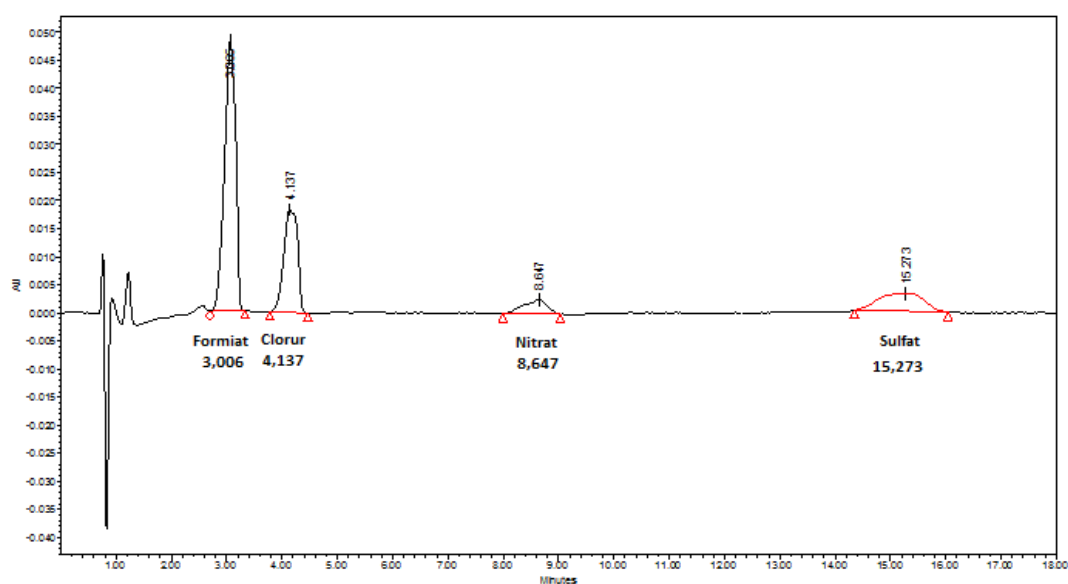


Fig. 39. Cromatograma amb detecció indirecta on s'indica el temps de retenció de cada anió

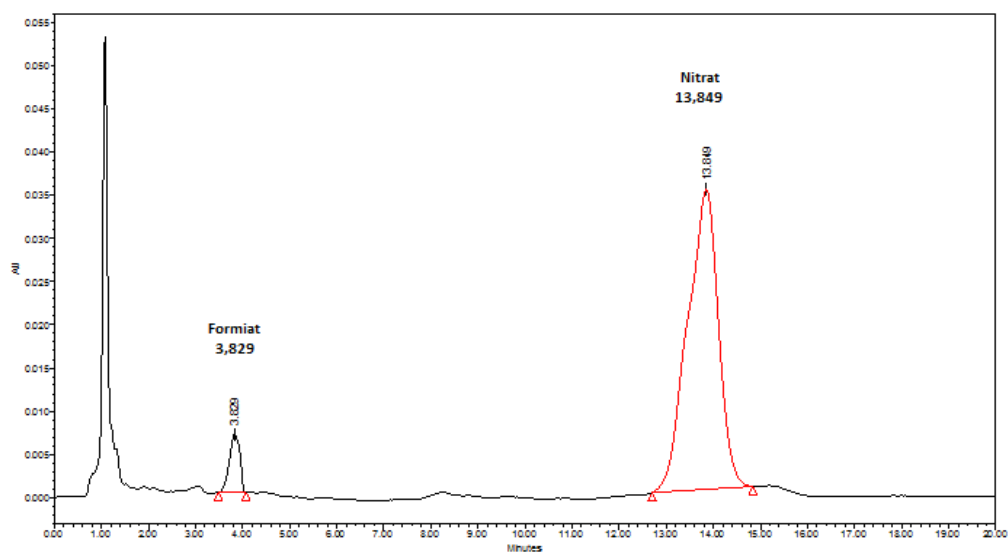


Fig. 40. Cromatograma amb detecció directa on s'indica el temps de retenció de cada anió

En les pells que continguin formiat i fosfat, la determinació de l'anió formiat serà complexa, ja que tal com s'ha observat a la Taula 29, els anions formiat i fosfat presenten el mateix temps de retenció quan s'utilitza el sistema de detecció indirecta.

La figura Fig. 41 mostra dos cromatogrames superposats de dos patrons multicomponents que es diferencien en un anió: un conté fosfat en comptes de formiat. S'ha realitzat una ampliació en el minut 3,011, on s'aprecia el solapament dels pics dels esmentats anions. El pic blau pertany al fosfat i el negre al formiat.

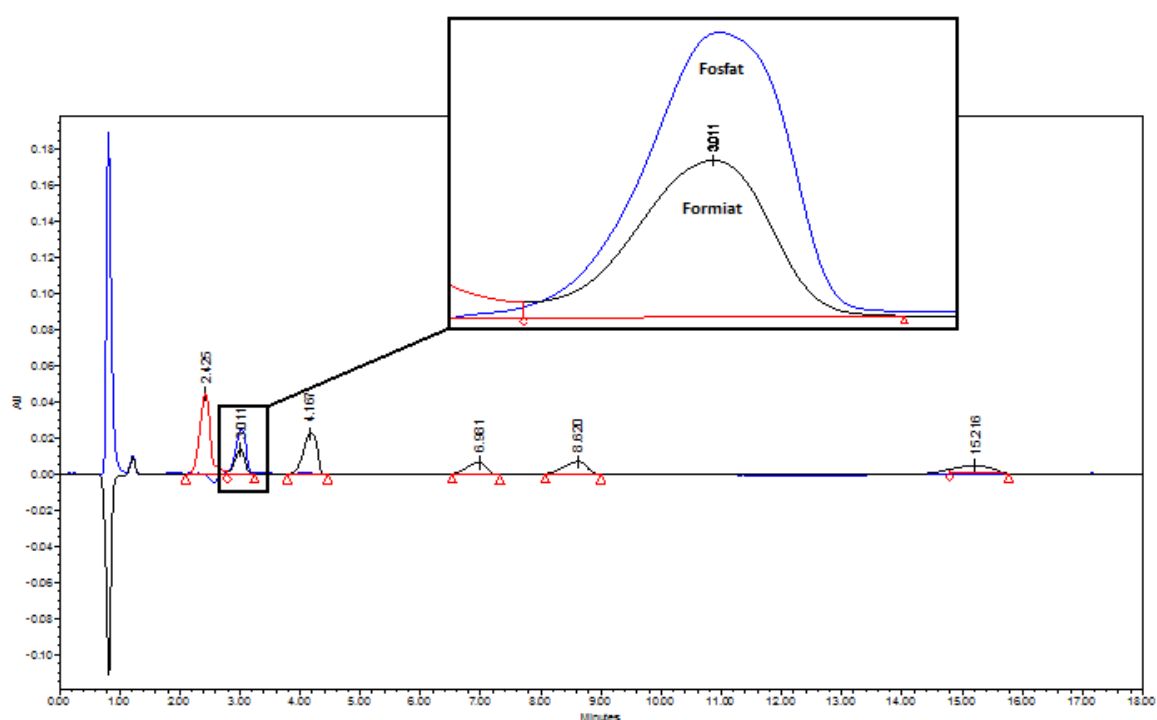


Fig. 41. Cromatogrames superposats de dos patrons multianions (un conté fosfat en comptes de formiat). Detecció indirecta

S'ha proposat un protocol, assajat amb patrons multicomponents, que permet determinar aquests anions quan coexisteixen en una mateixa pell.

A l'hora definir el protocol per a la determinació dels anions formiat i fosfat en pells, s'han tingut en compte les següents **consideracions**:

a) Si la mostra no conté ni formiat ni fosfat només s'aplica la cromatografia amb detecció indirecta per quantificar tots els anions de la pell. (En aquest cas, el cromatograma amb detecció indirecta no presenta pic en el temps característic del formiat i el fosfat).

b) Si la mostra conté fosfat i/o formiat la detecció indirecta no permet la determinació selectiva dels esmentats anions i cal realitzar també l'anàlisi amb detecció directa. El formiat absorbeix en l'UV-VIS i es pot detectar amb aquest sistema de detecció, mentre que el fosfat no és absorbent en aquest rang de longitud d'ona. Aquest fet permet confirmar la presència de formiat per comparació de l'espectre UV-VIS del pic i l'espectre d'un patró de formiat.

Quan el cromatograma amb detecció directa no presenta cap pic en el temps típic del formiat, es dedueix que la mostra no conté formiat, i el pic que apareixia en la detecció indirecta era degut al fosfat.

Si en la detecció directa apareix pic en el temps del formiat, cal contrastar els espectres UV-VIS del pic i d'un patró de formiat. Es presenten les següents possibilitats:

b.1) Si es produeix coincidència dels espectres de l'analit i del patró de formiat, es confirma la presència de formiat, i caldrà investigar si també la mostra presenta fosfat. És a dir, si el pic del cromatograma amb detecció indirecta és degut només al formiat, o bé a la mescla formiat+fosfat. (Posteriorment es detalla el protocol a seguir).

b.2) Quan no hi ha coincidència entre els espectres UV de l'analit i del patró formiat, es poden plantejar les següents opcions a la mostra:

-No conté l'anió formiat, i el pic és degut a la presència d'altres analits absorbents interferents.

-Conté formiat i altres analits absorbents que produeixen interferències (anions que tenen el mateix temps de retenció que el formiat).

Aquestes mostres complexes requereixen d'una tècnica complementària per tal d'investigar si el pic amb detecció indirecta correspon únicament al fosfat.

Les anteriors consideracions i les proves realitzades amb diferents mostres sintètiques van permetre dissenyar el següent **protocol**:

1. Injectar l'extracte emprant la **detecció indirecta**. Si no apareix cap pic a 2,9-3,0 minuts significa que la mostra no conté ni formiat ni fosfat. S'interpolen les àrees dels demás pics en les corresponents rectes de calibratge. La determinació ja es dona per finalitzada i no s'empra la detecció directa.
2. Si el cromatograma amb detecció indirecta presenta un pic a 2,9-3,0 minuts, es cromatografia l'extracte amb **detecció directa** i es valoren els resultats:
 - 2.1. Si no apareix pic a 3,8-3,9 minuts (temps de retenció del formiat amb detecció directa), es conclou que la mostra no conté formiat i el pic del cromatograma amb detecció indirecta és degut al fosfat. Es quantifica el fosfat mitjançant interpolació de l'àrea del pic de fosfat en la corresponent recta de calibratge amb detecció indirecta.
 - 2.2. Si apareix pic a 3,8-3,9 minuts (temps de retenció del formiat amb detecció directa) i es confirma la presència de formiat per comparació de l'espectre del pic obtingut amb el d'un patró, s'actua de la següent manera:
 - L'àrea del pic de formiat obtingut amb detecció directa s'interpola en la recta de calibratge i s'obté la concentració d'anió formiat.
 - Es calcula la concentració del pic obtingut a 2,0-3,0 minuts en el cromatograma amb detecció indirecta, suposant que el pic és només de formiat.
 - Es comparen les concentracions de formiat obtingudes pels dos sistemes de detecció:

-La coincidència en les concentracions indica l'absència de fosfat en la mostra pell.

-La no coincidència de les concentracions significa que el pic obtingut per detecció indirecta és degut a formiat i a fosfat. Per determinar l'àrea del pic que correspon al fosfat es calcula l'àrea que representa la concentració de formiat, obtinguda per detecció directa, en el pic d'indirecta i es resta l'esmentada àrea a l'àrea total del pic. La diferència correspon a l'àrea de fosfat, la qual s'interpol·la en la corresponent recta de calibratge per obtenir la concentració de fosfat.

2.3. Si apareix pic a 3,8-3,9 minuts i no es confirma la identitat del formiat perquè no hi ha coincidència entre els espectres del suposat pic de formiat i un patró, es realitza l'anàlisi fotolorimètrica de l'extracte amb l'objectiu de quantificar el fosfat present. (El protocol de la determinació colorimètrica de fosfat es troba a l'Annex 3). La concentració de fosfat obtinguda per fotolorimetria s'interpol·la en la recta de calibratge de fosfat amb cromatografia de detecció indirecta i, es calcula així l'àrea que representa el fosfat en el pic de fosfat+formiat. Es resta l'àrea del fosfat a l'àrea total del pic fosfat+formiat amb la finalitat de deduir l'àrea que pertany al formiat. L'àrea del formiat s'interpol·la en la corresponent recta de calibratge per determinar la seva concentració.

Segons el protocol anterior, la cromatografia amb detecció directa i indirecta, conjuntament amb la fotolorimetria, permet una estimació del contingut de fosfat en mostres complexes. El protocol s'ha verificat en mostres sintètiques que requereien aplicar l'etapa 2.3 del mateix. Per aconseguir quantificar de forma exacta el fosfat es recomana la tècnica ICP-OES.

En definitiva, en mostres complexes on no es pot confirmar el formiat amb detecció directa, el procediment suggerit proporciona una estimació de les concentracions de formiat i fosfat per laboratoris que no disposin ICP-OES. En la tesi no s'ha aprofundit en l'estudi de mostres de pell complicades. La continuïtat de la recerca en aquestes mostres complexes seria un bon treball de fi de màster per curts.

6.6. Estudi de l'eficàcia de l'extracció dels anions segons norma UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6)

Aquest apartat detalla l'estudi que va permetre definir la velocitat d'extracció i el nombre d'extraccions proposades en el protocol d'extracció (punt 6.5.2).

La determinació d'anions en la pell requereix una etapa prèvia d'extracció d'aquests ions. Existeix normativa vigent, relacionada amb la determinació de matèries solubles en la pell, que contempla procediments d'extracció. Aquestes normes són:

- UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6)
- ASTM D-2876 (2010)

A continuació es resumeixen els protocols descrits en els anteriors documents normatius (Taula 30):

Procediments d'extracció de matèries solubles en la pell
UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6) -Pesar 10 g de cuir assecat a l'aire, triturat i desengreixat prèviament en Soxlhet amb diclorometà segons IUC4 (ISO 4048:2008). -Afegir 500 mL d'aigua UP, tancar amb tap i agitar mecànicament a 50 ± 10 rpm durant 2 hores a $22,5 \pm 2,5$ °C. -Filtrar.
ASTM D-2876 (2010) (per pells adobades al vegetal) -Pesar 15 g de cuir triturat i desengreixat amb hexà (Standard D-3495, amb Soxlhet). -Afegir 100 mL d'aigua UP i realitzar l'extracció en un equip extractor Reed-Churchill Type a $35 \pm 0,5$ °C durant 3 h. -Filtrar.
NOTA: Les normes no indiquen l'ús d'aigua UP (ultrapura), però en la determinació d'anions mitjançant HPLC és requisit la utilització d'aigua de qualitat UP.

Taula 30. Procediments normalitzats d'extracció de matèries solubles en pell

Per quantificar eficaçment els anions de les pells és important aconseguir l'eficiència en el procés d'extracció. Interessa treballar amb les condicions que permetin solubilitzar la màxima quantitat d'anions. La investigació de la influència de tots els paràmetres que afecten l'extracció seria un treball laboriós, objecte d'una altra recerca. El plantejament d'aquest estudi necessitava acotar les variables a investigar, i, ja que hi havia normativa analítica de referència, es va decidir el següent:

1. **No investigar la forma d'extracció.** Adoptar el mètode EN ISO 4098:2006 (IUC6) però **modificant**:
 - *Les quantitats de pell i aigua* (conservant les proporcions): 1g de cuir i 50mL d'aigua.
 - *La velocitat d'agitació*: es va comprovar visualment que 50 rpm (velocitat indicada en la norma) és insuficient per provocar un règim turbulent que mulli totalment la pell. L'agitació adequada s'aconsegueix a velocitats entre 170-180 rpm. S'ha estudiat l'efecte de la velocitat d'agitació (apartat 6.6.1).
2. **No desengreixar les pells.** En rutina no es realitza desengreixat previ, només en pells hidrofugades (les que tenen alt contingut en greixos o altres productes que impedeixen que l'aigua "mulli" les fibres de pell). L'estudi de l'efecte del desengreixat en l'extracció es recomana per a un altre treball de recerca.
3. **Estudiar l'efecte de la velocitat d'extracció.** Comparar l'extracció lenta (50 rpm, recomanada en la ISO 4098:2006 (IUC6)) i l'extracció ràpida (170 rpm, modificació proposada)
4. **Contrastar l'extracció simple amb l'extracció múltiple.** Per comprovar si una única extracció aconsegueix extreure la totalitat dels anions de la pell es van realitzar múltiples extraccions de les mostres de pell (secció 6.6.2).

En definitiva, l'estudi de comprovació de l'eficàcia de l'extracció es va focalitzar en la influència de la velocitat d'extracció i del nombre d'extraccions.

6.6.1 Influència de la velocitat en l'eficàcia de l'extracció

Un dels paràmetres que pot afectar l'extracció dels anions d'una pell és la velocitat d'aquesta operació. Segons la norma IUC6 l'agitació ha de ser 50 ± 10 rpm. A la pràctica es va observar que aquest valor provocava una oscil·lació molt suau (insuficient per aconseguir un règim turbulent que mullés totalment la pell) i es va decidir comprovar l'efecte de la velocitat sobre l'extracció dels anions. Es van realitzar proves d'**extraccions simples** amb diferents pells a la velocitat d'agitació indicada en la norma, 50 ± 10 rpm, i a 170 ± 10 rpm (règim turbulent observat visualment).

Es van assajar **quatre mostres de pell** que no contenien simultàniament fosfat i formiat (per facilitar l'estudi), les mostres 1, 4, 6 i 7 de la Taula 27. Es van fer extraccions lentes i ràpides en cada mostra, sempre per **duplicat**, i seguint els procediments de la Taula 31. Les extraccions van ser simples.

Procediments d'extracció comparats (lenta/ràpida)
Extracció lenta (recomanada per la IUC6) <ul style="list-style-type: none"> - Pesar 1 g de cuir assecat a l'aire i triturat. - Afegir 50mL d'aigua UP, tancar amb tap i agitar mecànicament a 50 ± 10rpm durant 2 hores a temperatura entre 20-25°C. - Filtrar a través d'un filtre de plecs.
Extracció ràpida <ul style="list-style-type: none"> - Pesar 1 g de cuir assecat a l'aire i triturat. - Afegir 50mL d'aigua UP, tancar amb tap i agitar mecànicament a 170 ± 10 rpm (règim turbulent) durant 2 hores a temperatura entre 20-25°C. - Filtrar a través d'un filtre de plecs.
NOTA: Les normes no indiquen la utilització d'aigua UP (ultrapura), però en la determinació d'anions mitjançant HPLC és requisit l'ús d'aigua qualitat UP.

Taula 31. Procediment d'extraccions lentes i ràpides

Tots els extractes es van **cromatografiar per duplicat**, amb els sistemes de detecció indirecta i directa, i emprant les condicions de l'apartat 6.5.3.

6.6.1.1. Resultats i conclusions

Es presenten els resultats i les conclusions per a cada anió en cada tipus de pell i amb les dos velocitats assajades (de Taula 32 a la Taula 39). També es mostren cromatogrames comparatius de les extraccions lentes i ràpides (Fig. 42, Fig. 43, Fig. 44 i Fig. 45).

Els resultats s'expressen en mg/L (concentració de l'anió en l'extracte pell) i en mg/kg (mil·ligrams d'anió per cada kilogram de pell). La concentració en mg/L s'obté d'interpol·lar les àrees dels cromatogrames en les rectes de calibratge corresponents.

Com a **exemple**, es mostren els càlculs per obtenir els **mg de clorur** per kg de pell en la mostra 1.A.1 a partir de la concentració de l'anió en l'extracte en mg/L de la Taula 32:

$$20,5 \text{ mg/L} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{50 \text{ mL H}_2\text{O}}{1,000 \text{ g}} \cdot \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = 1025 \text{ mg Cl}^-/\text{kg}$$

▪ Pell 1

Aquesta mostra conté formiat, clorur i sulfat. L'anió formiat s'ha confirmat mitjançant l'espectre UV en el cromatograma amb detecció directa, i atès que la detecció indirecta ha proporcionat el mateix contingut de formiat, s'ha conclòs que la la pell 1 no conte fosfat. Igualment l'anàlisi de fosfat pel mètode fotolorimètric no ha detectat aquet anió. Les Taules 32 i 33 recullen els resultats dels dos tipus d'extraccions. La Fig. 42 compara els cromatogrames a les dues velocitats assajades.

Pell 1	Pes(g)	Formiat Detecció directa		Clorur Detecció indirecta		Sulfat Detecció indirecta	
		mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg
1.A.1	1,0000	32,7	1635	20,5	1025	7,98	399
1.B.1	1,0085	24,3	1205	14,6	724	7,37	365
Mitjana			1420		875		383

Taula 32. Resultats de la pell 1 en l'extracció lenta

Pell 1	Pes(g)	Formiat Detecció directa		Clorur Detecció indirecta		Sulfat Detecció indirecta	
		mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg
1.C.1	1,0015	74,3	3714	26,2	1308	9,69	484
1.D.1	1,0002	74,4	3718	26,6	1330	8,41	420
Mitjana			3716		1319		452

Taula 33. Resultats de la pell 1 en l'extracció ràpida

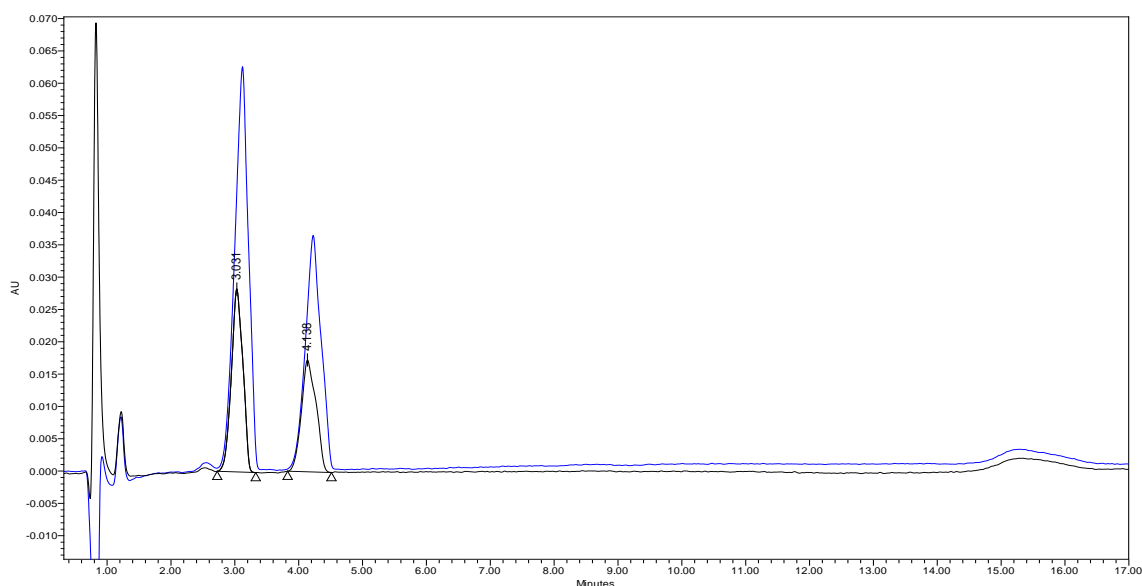


Fig. 42. Cromatograma comparatiu extracció ràpida (blau) i lenta (negra). Pell 1. Detecció indirecta

A la pell 1 s'observa que l'extracció ràpida:

- Proporciona millors resultats en tots els anions.
- Aconsegueix extreure aproximadament el doble d'anions totals que la lenta; i en relació als anions individuals, la ràpida aconsegueix, respecte la totalitat de cada anió, entre un 12-56 % més que l'extracció lenta (depenent de l'anió analitzat).

▪ Pell 4

La pell 4 conté formiat, clorur i sulfat. El formiat ha estat confirmat mitjançant la detecció directa. S'ha obtingut el mateix contingut en formiat amb els dos sistemes de detecció, i es dedueix per tant, que la mostra 4 no conté fosfat. Les Taules 34 i 35 ofereixen els resultats, i a la Fig. 43 es mostra un cromatograma comparatiu dels dos tipus d'extraccions.

Pell 4	Pes(g)	Formiat Detecció directa		Clorur Detecció indirecta		Sulfat Detecció indirecta	
		mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg
4.A.1	1,0062	52,0	2582	17,8	882	11,4	567
4.B.1	1,0116	55,9	2762	16,5	814	12,5	625
Mitjana			2672		848		596

Taula 34. Resultats de la pell 4 en l'extracció lenta

Pell 4	Pes(g)	Formiat Detecció directa		Clorur Detecció indirecta		Sulfat Detecció indirecta	
		mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg
4.C.1	1,0008	107	5346	25,3	1264	26,7	1334
4.D.1	1,0003	114	5698	26,7	1335	26,9	1345
Mitjana			5522		1300		1340

Taula 35. Resultats de la pell 4 en l'extracció ràpida

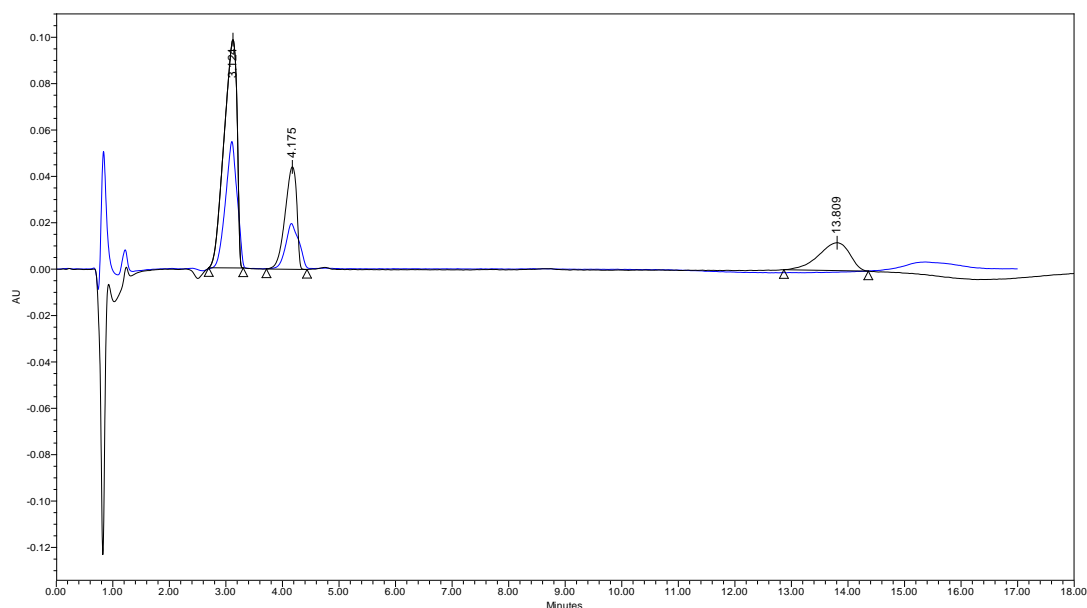


Fig. 43. Cromatograma comparatiu extracció ràpida (negra) i lenta (blau). Pell 4. Detecció indirecta

A la pell 4 s'observa que l'extracció ràpida:

- Proporciona millors resultats en tots els anions.
- Extreu aproximadament el doble d'anions totals que la lenta.
- En quant a cada anió individual, aconsegueix extreure entre el 32-55 % més que l'extracció lenta, depenent de l'anió analitzat.

▪ Pell 6

En aquesta mostra no s'ha detectat ni format ni fosfat. Els continguts en clorur i sulfat es troben a les taules Taula 36 i Taula 37, i la Fig. 44 compara els dos cromatogrames.

Extracció lenta					
Pell 6	Pes(g)	Clorur Detecció indirecta		Sulfat Detecció indirecta	
		mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg
6.A.1	0,9998	87,8	4391	72,4	3621
6.B.1	1,0004	87,4	4368	85,9	4293
Mitjana			4380		3957

Taula 36. Resultats de la pell 6 en l'extracció lenta

Extracció ràpida					
Pell 6	Pes(g)	Clorur Detecció indirecta		Sulfat Detecció indirecta	
		mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg
6.A.1	1,0027	90,4	4508	71,5	3565
6.B.1	1,0010	89,0	4446	57,6	2877
Mitjana			4477		3221

Taula 37. Resultats de la pell 6 en l'extracció ràpida

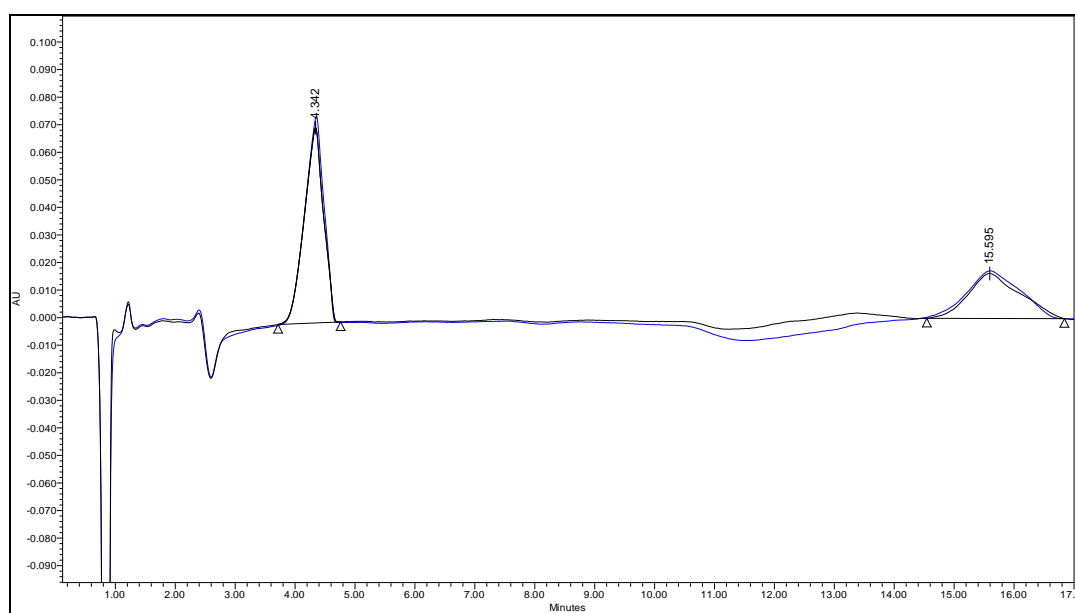


Fig. 44. Cromatograma comparatiu extracció ràpida (blau) i lenta (negra.) Pell 6. Detecció indirecta

S'observa que no hi ha diferències importants entre les dos velocitats d'extracció. Aquest fet pot ser degut a l'assoliment d'un equilibri ja que la pell és molt permeable a l'aigua, com és característic de les pells adobades amb tanins vegetals.

▪ Pell 7

A l'igual que en la mostra, no s'han detectat ni format ni fosfat. La Taula 38 i la Taula 39 recullen els resultats de l'extracció lenta i ràpida respectivament. La Fig. 45 compara els cromatogrames de les dues extraccions.

Extracció lenta					
Pell 7	Pes(g)	Clorur Detecció indirecta		Sulfat Detecció indirecta	
		mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg
7.A.1	1,0004	88,3	4413	93,6	4678
7.B.1	0,9999	91,6	4580	92,6	4630
Mitjana			4497		4654

Taula 38. Resultats de la pell 7 en l'extracció lenta

Extracció ràpida					
Pell 7	Pes(g)	Clorur Detecció indirecta		Sulfat Detecció indirecta	
		mg/L	mg/Kg	mg/L	mg/Kg
7.A.1	1,0000	89,0	4450	86,9	4345
7.B.1	1,0033	87,7	4371	89,8	4475
Mitjana			4411		4410

Taula 39. Resultats de la pell 7 en l'extracció ràpida

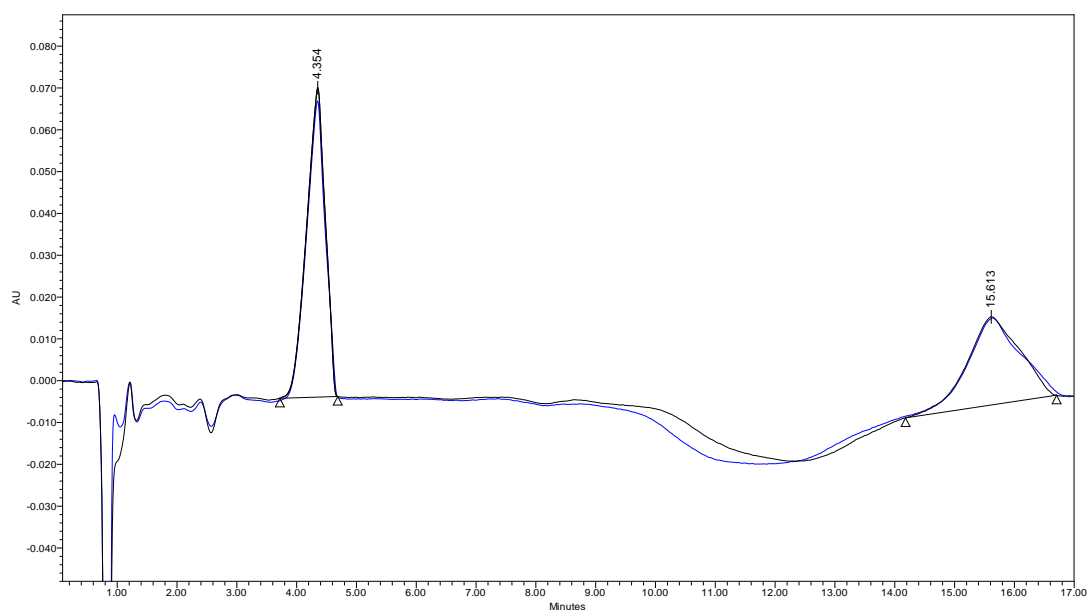


Fig. 45. Cromatograma comparatiu extracció ràpida (negra) i lenta (blau.) Pell 7. (Detecció indirecta)

En aquesta pell, de la mateixa manera que en la 6, no s'aprecien diferències rellevants entre els dos tipus d'extracció. També coincideix que aquesta pell té el mateix tipus d'adobament que la 6, a diferència de la 1 i la 4, que estan adobades amb crom.

De forma global, s'ha pogut comprovar que la velocitat d'extracció és un factor important. En algunes de les mostres estudiades, si es segueix la norma IUC6 (ISO 4098:2006), es pot deixar d'extreure més d'un cinquanta per cent de la totalitat dels anions que conté la pell. La velocitat de 170 ± 10 rpm, que proporciona un règim turbulent, no ha originat en cap cas resultats inferiors als obtinguts amb velocitat estipulada per la norma i, per tant, es la velocitat que es proposa.

6.6.2. Influència del tipus d'extracció (simple i múltiple) en l'eficàcia de l'extracció

Es va portar a terme un estudi comparatiu entre l'extracció simple i l'extracció múltiple amb l'objectiu de valorar si una única extracció era suficient per aconseguir dissoldre la totalitat dels anions continguts en la pell. Es van assajar per duplicat els 12 tipus de pells descrits a l'apartat 6.4. De cada pell es van realitzar extraccions contínues fins que ja no s'aconseguien treure més anions.

Cada extracte es va cromatografiar per duplicat amb els dos sistemes de detecció (directa i indirecta). Es va aplicar el procediment del punt 6.5. Es va tenir present que el residu de pols de pell humida resultant de la filtració al buit, que s'havia de sotmetre a la següent extracció consecutiva, contenia també anions procedents de l'extracte que l'acompanyava. Es van quantificar aquests anions per restar-los del contingut aniònic que es determinaria cromatogràficament en l'extracció successiva.

A continuació es presenta un **exemple dels càlculs** per obtenir els mg totals de clorur extrets per kg de pell en la mostra 5A i amb les dades de la Taula 40.

Nombre d'extracció	Clorur (Detecció indirecta)				
	mg/L en l'extracte	*mL	**mg	mg/L reals extracte (després de restar els anions que provenen de l'anterior extracció)	mg reals extrets
1	12,1	1,05	--	12,1	0,605
2	0,585	0,840	0,0127	0,331	0,0176
3	0,956	--	$4,91 \cdot 10^{-3}$	0,947	0,0476
mg totals/kg pell			669		
mg 1ªextracció/kg pell			605		
Pes inicial de la mostra de pell seca			1,0004 g		
*mL d'extracte que acompanyen la pell després de l'extracció (pell humida)					
**mg Cl ⁻ que conté la pell abans de fer la 2ª o 3ª extracció					

Taula 40. Resultats d'extraccions consecutives de la pell 5A (anió analitzat: clorur)

En la primera extracció s'extreuen 0,60 mg d'anió ($12,1 \text{ mg/L} \times 50 \cdot 10^{-3} \text{ L}$).

En aquest cas, el pes de la pell humida després de la primera extracció és 2,0504 g. Els mil·lilitres d'extracte que acompanyen la pell després de cada extracció es determinen per diferència dels pesos de la pell després i abans de l'extracció (la Taula 28 de l'apartat 6.5.2 també recull aquest càlcul): $2,0504 \text{ g} - 1,0004 \text{ g} = 1,05 \text{ mL}$

La pell humida resultant de primera extracció contenia 1,05 mL d'extracte. La concentració en clorur del primer extracte, determinada per cromatografia, va ser de 12,1 mg/L. Els mil·ligrams d'anions que contenia la pell abans de fer la 2ª extracció es calculen multiplicant els mil·lilitres del líquid que acompanyaven a la pell per la concentració d'anió que contenia l'extracte. Per tant, la pell contenia 0,01 mg de clorur abans de realitzar la segona extracció (que provenien del volum d'extracte que l'acompanyava):

$$\text{mg Cl}^{-} \text{ abans } 2^{\text{a}} \text{ extracció} = 1,05 \text{ mL} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \cdot 12,1 \text{ mg/L} = 0,0127 \text{ mg Cl}^{-}$$

La concentració en clorur del segon extracte, obtinguda per cromatografia, és 0,59 mg/L. Per calcular la concentració real d'anió extreta cal descomptar els mg de clorur que ja contenia la pell humida i que provenien del primer extracte:

$$\text{Conc real } 2^{\text{a}} \text{ extracció} = \frac{\left(\left(0,585 \text{ mg Cl}^{-} / \text{L} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \cdot 50 \text{ mL H}_2\text{O} \right) - 0,0127 \text{ mg Cl}^{-} \right)}{0,05 \text{ L H}_2\text{O}} = 0,331 \text{ mg Cl}^{-} / \text{L}$$

Per tant, els mil·ligrams reals extrets en la segona extracció són:

$$\text{mg reals extrets} = 0,331 \text{ mgCl}^- / \text{L} \cdot 0,05 \text{ L H}_2\text{O} = 0,0176 \text{ mgCl}^-$$

En les extraccions consecutives s'opera de la mateixa forma. Per obtenir els mil·ligrams totals d'anió per kilogram de pell es sumen els mil·ligrams reals extrets en cada una de les extracció i es divideix pel pes de la mostra en kilograms:

$$\text{mg Totals/Kg pell} = \frac{\sum \text{mg reals extrets}}{\text{Pes pell(Kg)}}$$

Per comparar l'eficàcia entre extracció simple i múltiple, s'ha calculat, per a cada anió, el percentatge que representa l'anió extret en la primera extracció respecte a la totalitat extreta de cada anió (denominat % Extracció 1). S'ha emprat la següent fórmula:

$$\% \text{ Recuperac\o} = \frac{\text{mg 1}^{\text{a}} \text{ extracci\o} / \text{Kg pell}}{\text{mg totals/Kg pell}} \cdot 100$$

6.6.2.1. Resultats i conclusions

Les taules següents (de la 41 a la 44) presenten els resultats mitjanats per als diferents anions en cada una de les pells. La columna “Nombre d’extracció” indica la quantitat d’extraccions consecutives que han calgut per extreure la totalitat de l’anió de la pell en qüestió.

El “% Extracció 1”, definit a l’apartat anterior, permet comparar l’eficàcia de l’extracció simple amb la múltiple. En els casos en què una única extracció ha aconseguit dissoldre totalment l’anió, el “% Extracció 1” és 100. Aquest paràmetre no s’ha calculat quan no s’ha aconseguit identificar l’anió.

Resultats per als anions format i fosfat

Mostra de pell	Format (detecció directa)			
	Nombre d’extraccions	mg totals/Kg pell	mg 1ª Ext./Kg pell	% Extracció 1
1	4	4650	3720	80
2	4	5740	5080	88
3	1	161	161	100
4	3	8910	5550	62
5	3	4690	4220	90
6	3	No detectat	No detectat	--
7	3	No detectat	No detectat	--
8	2	No detectat	No detectat	--
9	1	No confirmat	No confirmat	--
10	1	1140	1140	100
11	1	2860	2860	100
12	1	2440	2440	100

Taula 41. Extraccions consecutives de format en mostres de pell. Detecció directa. No confirmat: l’espectre no coincideix amb el de format, per tant no es pot confirmar la presència d’aquest anió, i això pot ser degut a que hi hagi més d’un analit diferent. (--): No es determina.

Mostra de pell	Formiat i/o fosfat (detecció indirecta) (expressat com a formiat, excepte en la pell 8)			
	Núm. extraccions	mg totals/Kg pell	mg 1ª Ext./Kg pell	% Extracció 1
1	4	5360 (sols formiat)	3890 (sols formiat)	73 (formiat)
2	4	7120 (formiat+ fosfat)	6237 (formiat+ fosfat)	88 (formiat+ fosfat)
3	1	179 (sols formiat)	179 (sols formiat)	100 (sols formiat)
4	3	8990 (sols formiat)	5690 (sols formiat)	63 (sols formiat)
5	3	7310 (formiat +fosfat)	5160 (formiat+fosfat)	78 (formiat+ fosfat)
6	3	No detectats ni fosfat ni formiat		-
7	3	No detectats ni fosfat ni formiat		-
8	2	46 (sols fosfat) Expressat com a fosfat	46 (sols fosfat) Expressat com a fosfat	100
9	3	(identitats no confirmades)		--
10	3	1730 (fosfat+formiat)	1030 (fosfat+formiat)	59
11	3	8380 (fosfat+formiat)	2770 (fosfat+formiat)	33
12	3	3950 (fosfat + formiat)	2530 (fosfat + formiat)	64

Taula 42. Extraccions consecutives formiat i/o fosfat en mostres de pell. Detecció indirecta

Resultats per l'anió clorur

Mostra de pell	Clorur (detecció indirecta)			
	Núm. extraccions	mg totals/Kg pell	mg 1ª Ext./Kg pell	% Extracció 1
1	4	1420	1290	91
2	4	38200	37200	97
3	2	No detectat	No detectat	--
4	3	2310	1300	56
5	2	653	603	92
6	3	4670	4470	96
7	3	4540	4400	97
8	2	1000	933	93
9	3	1100	455	41
10	3	1100	337	31
11	3	1030	293	28
12	3	1590	929	58

Taula 43. Extraccions consecutives de clorur en mostres de pell. Detecció indirecta

Resultats per l'anió sulfat

Mostra de pell	Sulfat (detecció indirecta)			
	Núm. Extraccions	mg totals/Kg pell	mg 1ª Ext./Kg pell	% Extracció 1
1	1	451	451	100
2	1	9980	9980	100
3	1	298	298	100
4	3	1760	1340	76
5	1	1270	1270	100
6	3	3690	3220	87
7	3	5250	4400	84
8	1	2830	2830	100
9	3	1240	799	64
10	3	1300	785	60
11	3	304	70	23
12	2	883	803	91

Taula 44. Extraccions consecutives de sulfat en mostres de pell. Detecció indirecta.

Pells amb nitrats

Es va observar la presència de nitrat en els cromatogrames de les pells acabades (mostres nº 9, 10, 11 i 12) en un rang de concentracions entre 40-800 mg/kg pell.

Per determinar si l'origen d'aquest anió és d'un polímer emprat com a top en l'acabat de les pells, com és el cas de la nitrocel·lulosa, es van analitzar per IR ATR (espectroscòpia d'infraroig amb reflectància total atenuada). El resultat és positiu si apareixen les següents bandes característiques del nitrat a l'espectre: 1650-1660 (forta); 1280 (forta); 1070 (forta); 840 (forta) (161).

Segons els espectres IR ATR obtinguts, només la pell 12 conté nitrocel·lulosa (Fig. 46). En les altres pells es determinen les bandes característiques del poliuretà.

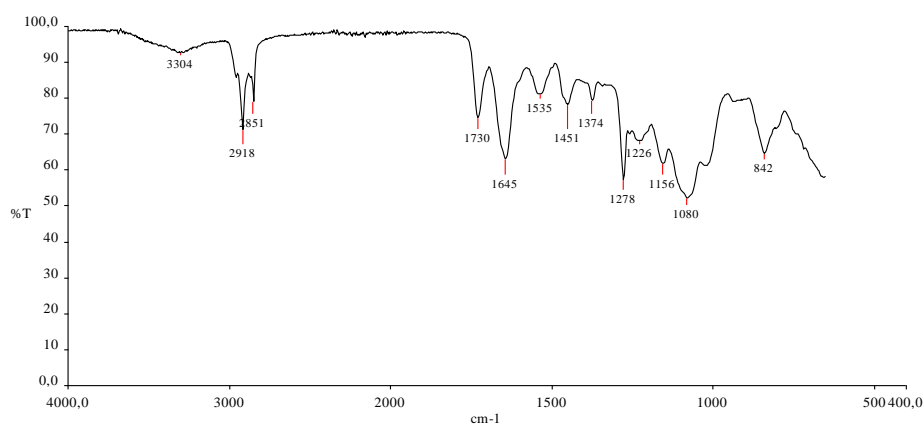


Fig. 46. Espectre IR ATR pell 12

No s'ha establert una correlació entre presència de nitrocel·lulosa i contingut de nitrat en l'extracte aquós. Es desconeix de quin producte o procés provenen els nitrats solubles detectats en les pells 9, 10, 11 i 12. No es va aprofundir en la recerca de l'origen d'aquest anió perquè no era l'objectiu d'aquest treball. En tot cas, seria un tema a investigar en estudis posteriors. Tot i així, ja que el nitrat només apareix en les pells acabades, es va consultat a un tècnic especialista en productes químics aplicats a la indústria de la pell (162). La hipòtesi plantejada va ser la possible descomposició d'algun component polimèric de l'acabat com a conseqüència de l'elevada temperatura del procés de planxat.

En definitiva, s'observa que la majoria de pells analitzades necessiten més d'una extracció consecutiva per poder obtenir el valor real d'anions que conté la pell. La diferència entre els mil·ligrams totals extrets i els mil·ligrams d'una única extracció és molt més elevada en les pells acabades que en les semiacabades. Probablement aquestes diferències són degudes al tractament superficial de les pells amb acabat. Caldria realitzar un desengreixat per poder determinar més eficaçment els anions de les pells acabades.

La Fig. 47 mostra un cromatograma comparatiu de tres extraccions consecutives de la pell 12.

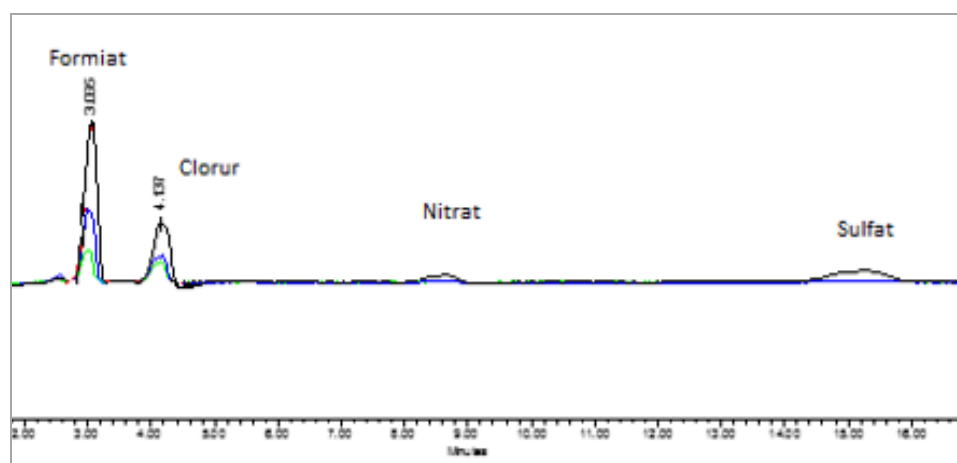


Fig. 47. Cromatograma comparatiu (detecció indirecta) de les tres extraccions consecutives pell 12
(negre=1ª extracció, blau=2ª extracció, verd=3ª extracció)

Les concentracions aniòniques varien segons la pell. Els cuirs analitzats contenen formiat en concentracions màximes de 8900 mg/kg pell. En el cas de l'anió clorur, la concentració més elevada és de l'ordre 38200 mg/kg. Per l'anió sulfat s'obtenen de 304 a 9980 mg/kg pell. En les mostres de pells acabades s'han trobat valors de nitrat compresos entre 40 i 800 mg/kg pell.

6.7. Exploració de la validació del mètode

Els conceptes relacionats amb la validació de mètodes s'han definit al Capítol 4. Des d'un punt de vista pràctic, és recomanable realitzar uns assajos preliminars que proporcionin una estimació aproximada de la validesa d'un mètode. Quan el mètode no s'ha d'utilitzar rutinàriament, també és permisible una validació parcial (133).

Per a la determinació d'anions en pells s'ha iniciat una validació interna basada en l'estudi dels següents paràmetres: selectivitat, linealitat i rang, límit de detecció, límit de quantificació, precisió i exactitud. Totes les proves s'han realitzat amb la mostra 4, descrita a la Taula 27, que conté formiat, clorur i sulfat, i amb la metodologia proposada en el punt 6.5.

6.7.1. Selectivitat

En el Capítol 5, durant la selecció de les condicions cromatogràfiques, va quedar demostrada la selectivitat de la metodologia amb detecció indirecta en la determinació dels anions inorgànics d'interès en adoberia. Es treballa amb unes condicions que no provoquen interferències. La selectivitat amb detecció indirecta es fonamenta en la comparativa del temps de retenció dels components de la mostra amb els temps de retenció dels patrons. En totes les sessions de treball s'injectaven patrons de control per comparar els temps de retenció. L'única *interferència* detectada és la del formiat amb el fosfat, però aquest inconvenient s'ha superat amb el procediment descrit a l'apartat 6.5.3.

En el cas de la detecció directa, també s'empra el temps de retenció per identificar els pics i a més, la selectivitat es veu reforçada amb el detector PDA que confronta l'espectre UV/VIS de cada pic amb els espectres estàndard dels patrons emmagatzemats en la llibreria digital.

6.7.2. Linealitat i rang

S'ha comprovat la linealitat de totes les rectes de calibratge emprades. Aquestes s'han construït amb 5 patrons en l'interval de concentracions deduït experimentalment a partir d'assajos amb mostres reals de pell. Els resultats es troben a la Taula 20 i a la Taula 26 dels apartats 5.4.10 i 5.5.6 respectivament.

6.7.3 Límit de detecció

S'han calculat els límits de detecció per als anions clorur, nitrat, fosfat, sulfat i formiat a les condicions cromatogràfiques emprades en la determinació d'anions en pells i d'acord amb la fórmula de l'apartat 4.3.3. Alguns d'ells es van determinar durant la posada a punt de la metodologia (Taula 16 i apartat 5.5.5). Tot seguit es mostren els resultats expressats en mg/kg (Taula 45).

Límits de detecció		
Fase mòbil 1mM Bifalal potàssic, 8% ACN, pH 6,2 (260nm)		
Analit	mg/L	mg/kg
Clorur	0,10	5,0
Nitrat	0,30	15
Fosfat	0,42	21
Sulfat	0,75	37
Formiat	0,40	20
Fase mòbil 1 mM sulfat sòdic, 8% ACN, pH 6,8 (202 nm)		
Analit	mg/L	mg/kg
Formiat	0,50	25

Taula 45. Límits de detecció dels anions

6.7.4. Precisió

La precisió es va valorar amb assajos de precisió intermèdia i repetibilitat. En tots els casos es va emprar la mostra de pell 4 i amb extracció simple.

La valoració dels resultats es va fer mitjançant el model de precisió de Horwitz. Quan no es disposa un mètode amb el qual comparar els valors calculats de precisió, els valors teòrics de repetibilitat i reproductibilitat poden calcular-se aplicant l'equació de Horwitz (137), definida com (163):

$$RSD_H (\%) = 2^{(1-0,5 \cdot \log C)}$$

On:

$RSD_H (\%)$ =Desviació estàndard relativa de Horwitz

C =concentració de l'analit en tant per 1 (o en potència de 10) (veure Taula 46).

Concentració		% RSD_H
10^{-6}	1 ppm	16,0
10^{-5}	10 ppm	11,3
10^{-4}	100 ppm	8,0
10^{-3}	0,10 ppm	5,7
10^{-2}	1%	4,0
10^{-1}	10%	2,8
1	100%	2,0

Taula 46. Equivalència entre % RSD de Horwitz i la concentració

El valor de RSD obtingut es compara amb el predit per Horwitz (RSD_H) mitjançant el paràmetre Horrat:

$$r \text{ Horrat} = \frac{RSD}{RSD_H}$$

Si el valor del paràmetre Horrat es igual o inferior a 2 es pot considerar que el mètode té valors de precisió acceptables.

Precisió intermèdia del mètode

Es va analitzar per quintuplicat una pell, en cinc dies diferents, al llarg d'un període total d'un mes i en intervals de temps equitatius. Totes les anàlisis es van fer per duplicat, i de cada extracció també es va cromatografiar l'extracte per duplicat. Els resultats es troben recollits a la Taula 47.

Pell 4	Formiat (detecció directa)	Clorur (detecció indirecta)	Sulfat (detecció indirecta)
	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Dia 1 (4.A.1)	5782	1319	1326
Dia 2 (4.B.1)	5630	1332	1353
Dia 3 (4.C.1)	5823	1272	1331
Dia 4 (4.D.1)	5820	1271	1365
Dia 5 (4.E.1)	5428	1237	1348
Mitjana	5697	1286	1345
%RSD	±3,0	±3,0	±1,2
%RSD_H	±4,3	±5,5	±5,4
Horrat	0,7	0,5	0,2

Taula 47. Reproductibilitat del mètode (precisió intermèdia)

Repetibilitat

Es va estudiar la repetibilitat **del mètode** i la repetibilitat **instrumental** (etapa de determinació cromatogràfica).

Per assajar la **repetibilitat del mètode**, es van realitzar cinc extraccions un mateix dia.

Tots els extractes s'injectaren al cromatògraf per duplicat (Taula 48).

Pell 4	Formiat (detecció directa)	Clorur (detecció indirecta)	Sulfat (detecció indirecta)
	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Extracció 1(4.A.1)	5880	1308	1327
Extracció 2(4.B.1)	5522	1333	1354
Extracció 3(4.C.1)	5356	1262	1332
Extracció 4(4.D.1)	5685	1333	1242
Extracció 5(4.E.1)	5305	1225	1339
Mitjana	5550	1292	1339
%RSD	±4,3	±3,7	±0,77
%RSD_H	±4,4	±5,4	±5,4
Horrat	1,0	0,7	0,14

Taula 48. Repetibilitat del mètode

D'altra banda, per estudiar la **repetibilitat instrumental** es van omplir dos vials de l'extracte 1 i es van programar quatre injeccions per l'HPLC. La Taula 49 mostra els resultats.

Pell 4	Formiat (detecció directa)	Clorur (detecció indirecta)	Sulfat (detecció indirecta)
	mg/kg	mg/kg	mg/kg
4.A.1	5703	1304	1354
4.A.1	5724	1306	1338
4.A.1	5751	1305	1303
4.A.1	5739	1301	1351
4.A.1	5744	--	--
Mitjana	5732	1304	1336
%RSD	±0,33	±0,16	±1,7
%RSD_H	±4,3	±5,4	±5,4
r Horrat	0,1	0,02	0,3

Taula 49. Repetibilitat instrumental

Conclusions

L'aplicació del model de Horwitz als assajos de precisió ha proporcionat valors acceptables de reproductibilitat i de repetibilitat (tant de mètode com instrumental).

La repetibilitat cromatogràfica del sulfat és pitjor que la dels altres anions per la dificultat d'integració d'aquest pic d'elevat temps de retenció.

6.7.5. Exactitud

L'exactitud es va avaluar mitjançant l'anàlisi de mostres addicionades. Es van afegir a la mostra de pell nº 4 quantitats conegudes de patrons per realitzar les proves de recuperació o fortificació.

A 1 gram de pols de pell es van addicionar 50mL de dissolució multipatró de concentració coneguda (50 mg/L de formiat, 15 mg/L de clorur i 15 mg/L de sulfat) i es va realitzar una extracció simple. L'extracte es va injectar per duplicat a l'HPLC. També es va cromatografiar l'extracte de pell sense addicionar i el patró multianió. Es va seguir el procediment de l'apartat 6.5. Es realitzaren cinc rèpliques.

La fórmula aplicada en el càlcul de la fortificació va ser la següent :

$$\% \text{ Recuperació} = \frac{[]_{m+p} - []_p}{[]_m} \cdot 100$$

$[]_{m+p}$:concentració obtinguda en la mostra amb el patró. $[]_p$:concentració del patró. $[]_m$: concentració de la mostra de pell.

La Taula 50 recull els resultats.

% de Recuperació			
Mostra	Formiat Directa	Clorur	Sulfats
4.A.1	92	124	122
4.B.1	103	124	125
4.C.1	105	134	114
4.D.1	98	119	116
4.E.1	99	123	112
Mitjana	99	125	118

Taula 50. Estudi de recuperació

S'observen valors de recuperació compresos entre 99 - 125 %, els quals considerem dins el rang d'acceptabilitat donada la dificultat de les mesures efectuades.

6.7.6. Conclusions de l'estudi exploratori sobre la validació

L'estudi exploratori sobre la validació ha estat satisfactori:

- S'ha demostrat la selectivitat del mètode en la determinació d'anions en pells. Els casos més conflictius es trobarien en pells que continguin simultàniament fosfat i formiat (temps de retenció coincidents en detecció indirecta), però s'ha proposat un mètode que resol aquesta dificultat.
- S'han construït les rectes de calibratge i s'ha comprovat la bondat de les mateixes a través del coeficient de correlació r i del contrast F de l'anàlisi ANOVA.
- L'estudi de precisió compleix el criteri d'acceptabilitat del model de precisió de Horwitz.
- S'han obtingut valors adequats en els % de recuperació.

6.8. Conclusions generals

Al llarg del capítol s'han presentat les conclusions parcials de cada una de les etapes del procés de recerca. A continuació s'exposen les conclusions generals i les recomanacions de continuïtat.

L'estudi de la **millora del procés d'extracció** s'ha centrat en dos factors importants: la velocitat i el nombre d'extraccions. Els resultats confirmen que l'agitació a 50 ± 10 rpm i la realització d'una única extracció, segons el protocol descrit a la norma UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6), són insuficients per extreure la totalitat dels anions:

-Es proposa treballar a una velocitat de 170 ± 10 rpm (règim turbulent) perquè s'obtenen resultats que són sempre millors o iguals als obtinguts amb la velocitat indicada per la norma IUC6. En algunes de les mostres estudiades, si es segueix la norma, es pot deixar d'extreure més d'un cinquanta per cent de la totalitat dels anions que conté la pell.

-Les anàlisis de dotze mostres de pell han permès concloure que en el 50 % de les mostres s'aconsegueix extreure, amb una única extracció, aproximadament el 75 % del contingut aniònic. S'ha observat que en les pell acabades el rendiment d'una única extracció és molt inferior a l'obtingut en les pells no acabades. Probablement caldria realitzar un desengreixat per determinar més eficaçment els anions en les pells acabades. No obstant això, aquesta conclusió hauria de confirmar-se amb un ventall més ampli de pells.

Es determina doncs, que el procediment d'extracció descrit en la norma UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6) proporciona només càlculs estimatius. Els resultats obtinguts seguint el protocol de la norma cometent sistemàticament un error per defecte. S'obté un resultat molt inferior al contingut aniònic real perquè la norma indica realitzar una única extracció. Tal com assenyala la literatura sobre l'operació d'extracció (29), sempre és més eficaç l'extracció múltiple que la simple, fet que recolza els resultats obtinguts.

S'ha demostrat la **viabilitat** del mètode cromatogràfic per a la **determinació dels anions** clorur, format, fosfat, sulfat i nitrat **en pells**:

- Es recomana la cromatografia amb detecció directa per a la determinació de format..
- En mostres complexes que contenen format i fosfat i no es pot confirmar la identitat del format amb detecció directa, s'ha dissenyat un protocol que permet la quantificació d'aquests anions. En aquests casos es recomana determinar el fosfat, en l'extracte, per una mesura de ICP-OES.
- S'ha observat que les concentracions aniòniques varien segons la pell. Les mostres analitzades contenen format en concentracions màximes de 8900 mg/kg pell. En cas de l'anió clorur la concentració màxima és de l'ordre és de 38210 mg/L. Per l'anió sulfat s'obtenen unes concentracions de l'ordre de 304 a 9980 mg/kg pell. En les mostres de pells acabades s'ha trobat nitrat en concentracions de l'ordre de 40 a 800 mg/kg pell.
- S'han obtingut dades òptimes en l'exploració de la validació del mètode (selectivitat, linealitat, límit de detecció, precisió i exactitud).

Aquesta recerca és una primera aportació a la determinació d'anions en pell mitjançant cromatografia iònica, i suposa el pas inicial per a la millora de la norma UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6) sobre l'extracció de matèries solubles aplicada a mostres de cuirs.

Posteriorment, els nous procediments cromatogràfics han permès a la Càtedra A3 In Leather Innovation un estudi a gran escala, per a una firma de gran luxe, amb l'objectiu d'investigar la tendència de corrosió en les pells. Els clorurs i els sulfats s'han determinat per la metodologia amb detecció indirecta proposada en la tesi.

Es recomana, com a propostes de continuïtat en posteriors treballs:

- Aprofundir en l'estudi de l'eficàcia del procés d'extracció. Un dels efectes a valorar és el desengreixat de les pells acabades.
- Estendre la recerca a mostres complexes que continguin formiat i fosfat però que no permeten la confirmació del formiat amb detecció directa.
- Ampliar la validació a més mostres de pell.



Capítol 7. Exploració d'altres aplicacions de la metodologia per CI: productes químics del sector adober, mostres mediambientals i d'altres sectors

7.1. Introducció i objectiu

En aquest capítol es presenten **aplicacions** de la metodologia cromatogràfica, desenvolupada al Capítol 5, a diferents productes químics del sector adober i a mostres ambientals i d'altres sectors. També s'exposen els resultats de la participació en **assajos d'aptitud** enfocats a mostres d'aigües residuals.

L'**objectiu principal** és avaluar el funcionament del mètode cromatogràfic en mostres reals.

Els procediments descrits han estat assajats prèviament amb l'objectiu de determinar el volum d'injecció més adequat a cada mostra.

Totes les determinacions cromatogràfiques s'han realitzat amb el cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC) amb injector automàtic i detector UV: Waters ALLIANCE 2695 Module equipat amb el detector PhotoDiode Array (PDA) 2996.

7.2. Determinació de clorurs i sulfats en colorants, dispersants naftalensulfònics, extractes de mimosa, olis i àcids fòrmics (detecció indirecta)

A l'apartat 2.2 s'han exposat els inconvenients que comporta un excés d'impureses en els productes químics del sector de la pell i la importància del seu control analític.

S'ha aplicat la metodologia cromatogràfica desenvolupada al Capítol 5 a la determinació d'impureses de diversos productes químics comercials del sector adober.

La columna cromatogràfica utilitzada en aquest treball no admet components no iònics; i, com a precaució, s'ha realitzat un pretractament d'extracció en fase sòlida (SPE) a les mostres de colorants, dispersants naftalensulfònics i olis (a causa de la possibilitat que presentessin substàncies lipòfiles). En els extractes de mimoses no es va efectuar l'esmentat tractament perquè són extractes aquosos d'escorça vegetal que no contenen components lipòfils. Per avaluar l'efecte del pretractament SPE sobre el contingut aniònic es va dur a terme un estudi de recuperació.

7.2.1. Mostres

Dos colorants marrons per bombo (comercialitzats en el mercat espanyol), dos dispersants naftalensulfònics, dos extractes de mimosa, cinc olis sulfatats comercials per adoberia i cinc àcids fòrmics concentrats comercials.

7.2.2. Mètodes

En tots els mètodes s'ha emprat aigua ultrapura de Milli-Q. Les fases mòbils s'han preparat d'acord a les indicacions de l'apartat 5.2.

En cada sessió de treball s'han injectat patrons de control dels anions per confirmar els pics dels analits mitjançant el temps de retenció i també per comparativa d'espectres en el cas de la detecció directa. S'han fet dos rèpliques de totes les anàlisis i les injeccions també s'han realitzat per duplicat.

Determinació de clorurs i sulfats en colorants, dispersants naftalensulfònics i olis (detecció indirecta)

-Es va pesar amb exactitud la mostra i es va dissoldre i enrasar amb aigua en matràs aforat segons la Taula 51:

Tipus de mostra	Pes (g)	Volum final (mL)
Colorants	1,0000	1000
D. Naftalensulfònics		
Olis	8,0000	100

Taula 51. Preparació de les dissolucions de les mostres

-Es va activar un cartutx SPE_C18 (extracció en fase sòlida): es van eluir lentament al seu través 5 mL d'acetonitril i tot seguit 15 mL d'aigua.

-Una alíquota de 5 mL de la dissolució del producte es va passar pel cartutx SPE activat, seguit de 15 mL d'aigua. L'eluat es va recollir i enrasar amb aigua en un matràs de 25 mL (Fig. 48).



Fig. 48. Filtració amb cartutx SPE

-Una alíquota de la dissolució anterior es va filtrar amb filtre de xeringa de nylon de 0,45 micres, es va transferir a un vial de mostra i es va injectar per duplicat al sistema d'HPLC. Les condicions cromatogràfiques van ser les següents:

- Flux: 0,9 mL/min
- Fase mòbil: Biftalat potàssic 1mM amb 8 % d'acetonitril, pH $6,2 \pm 0,2$.
- Temperatura: 30 ± 1 °C
- Volum d'injecció: 20 µL per a colorants i naftalensulfònics, 10 µL per a olis
- Detecció: Indirecta con PDA i recuperació del cromatograma a 260 nm.
- Inversió dels pics negatius mitjançant multiplicació pel factor (-1).

Les àrees dels pics s'interpolaven en les rectes de calibratge corresponents (Taula 20 de l'apartat 5.4.10).

Els temps de retenció en aquestes condicions es troben a la Taula 52, tot i que es recomana injectar patrons de control per confirmar la identitat del pics.

Anió	Temps de retenció (minuts)
	Detecció Indirecta
Formiat	3,0
Clorur	3,8
Nitrat	7,9
Sulfat	14,0

Taula 52. Temps de retenció amb fase mòbil biftalat potàssic 1mM amb 8% d'acetonitril, pH $6,2 \pm 0,2$. Temperatura 30°C, 260 nm i detecció indirecta

Les imatges de la Fig. 49 comparen una mostra inicial d'oli amb les dilucions previes a l'anàlisi. S'aprecia la terbolesa pròpia de les emulsions.

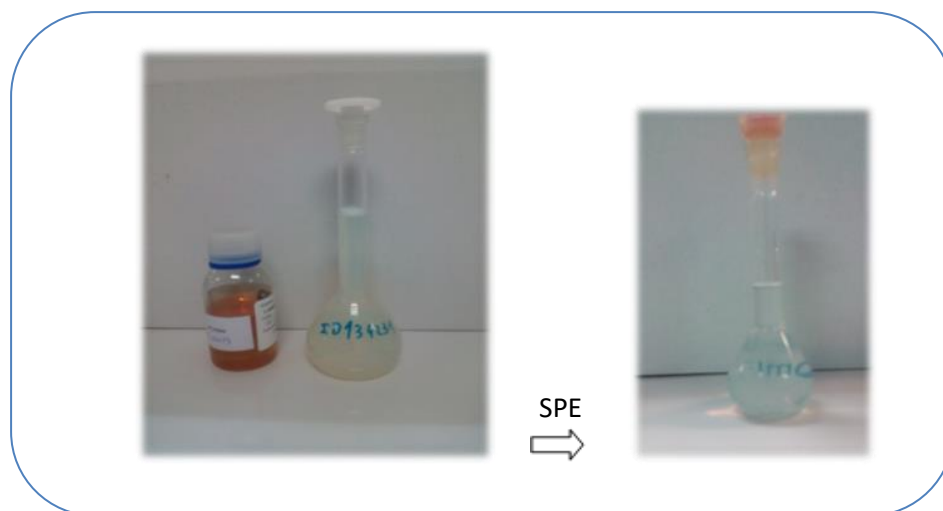


Fig. 49. Mostra d'un oli i de les dilucions prèvies a l'anàlisi cromatogràfica

Estudi del percentatge de recuperació del procés d'extracció en fase sòlida

Per avaluar l'efecte del pretractament amb cartutx SPE sobre el contingut aniònic es va realitzar un estudi de recuperació. Es van preparar tres patrons multianió de concentració 25 mg/L en cada un dels anions (fluorur, fosfat, clorur, bromur, nitrat, sulfat). Els patrons es van cromatografiar abans i després de ser filtrats a través del cartutx SPE. L'activació prèvia del cartutx es va fer eluint lentament al seu través 5 mL d'acetonitril i tot seguit 15 mL d'aigua. El % de recuperació per a cada anió es va calcular a partir de la relació entre la concentració aniònica amb filtració SPE i la concentració aniònica sense filtració.

Determinació de clorurs i sulfats en extractes de mimosa (detecció indirecta)

- Es va pesar amb exactitud 1 g de mostra i es va dissoldre i enrasar amb aigua en un matràs aforat de 1 L.
- Una alíquota de 5 mL de l'anterior dissolució es va dur a un matràs de 25 mL i s'enrasà amb aigua.
- L'anterior dilució es va injectar per duplicat, prèvia filtració amb filtre de xeringa de 0,45 micres. Les condicions cromatogràfiques van ser les mateixes que les utilitzades en la determinació d'anions en colorants, dispersants naftalenisulfònics i olis.

Determinació d'impureses en àcids fòrmics comercials (detecció indirecta)

- Es van pesar amb exactitud 0,5 g d'àcid fòrmic i es van enrasar en un matràs aforat de 500 mL.
- Es va extreure una alíquota de 25 mL de l'anterior dissolució i es va enrasar amb aigua UP en un matràs de 100 mL.
- Una porció de la dilució resultant es va filtrar amb filtre de xeringa de 0,45 micres, es va transferir a un vial de mostra i es va injectar al sistema d'HPLC utilitzant les mateixes condicions cromatogràfiques que les emprades en la determinació d'impureses aniòniques en colorants i dispersants naftalenisulfònics.

7.2.3. Resultats i conclusions

Estudi del percentatge de recuperació del procés d'extracció en fase sòlida

Es va comprovar que el procés de filtració amb cartutx SPE no produeix pèrdues d'anions. La Taula 53 mostra els resultats obtinguts en l'estudi de recuperació.

Anió	Fluorur	Fosfato	Clorur	Bromur	Nitrat	Sulfat
% Recuperació	99,5	98,4	99,1	98,4	99,1	99,3

Taula 53. Resultats de l'avaluació de l'efecte del pretractament SPE sobre el contingut aniònic

Determinació de clorurs i sulfats en productes químics comercials (colorants, dispersants naftalsulfònics, extractes de mimosa, olis i àcids fòrmics) mitjançant detecció indirecta

Els continguts de les impureses salines detectades en els productes analitzats s'expressen a la Taula 54. Les dues mostres de colorants contenen impureses aniòniques de clorurs i sulfats. Les mostres de mimoses analitzades no van produir cap pic en els cromatogrames. Els continguts aniònics obtinguts en els olis van ser baixos. Totes dues mostres de naftalensulfònics van presentar impureses de sulfats. Respecte a les mostres d'àcids fòrmics, en una d'elles es van detectar impureses de sulfats i en una altra de clorurs.

	Clorurs (expressats com a % NaCl)	Sulfats (expressats com a % Na ₂ SO ₄)
Colorant A	18,7	45,1
Colorant B	14,0	45,6
D.Naftalensulfònic A	No detectat	18,0
D.Naftalensulfònic B	No detectat	29,9
Oli 1	0,06	1,17
Oli 2	0,05	1,23
Oli 3	0,03	1,35
Oli 4	0,03	0,96
Oli 5	0,05	1,11
Àcid fòrmic A	0,60	No detectat
Acido fòrmic B	No detectat	12,3
Mimosa A i Mimosa B	No detectats	

Taula 54. Contingut d'impureses aniòniques (% en pes) en els productes químics analitzats

Les següents figures (Fig. 50, Fig. 51) mostren, respectivament, cromatogrames d'un colorant i d'un àcid fòrmic.

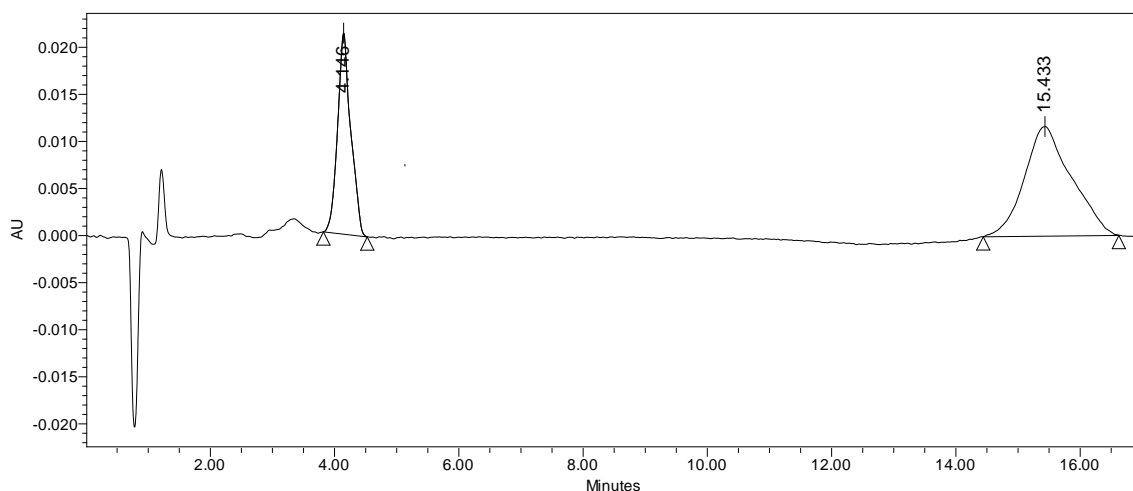


Fig. 50. Cromatograma d'una mostra de colorant marró per a bombo. Pics: Clorur 4,140 min; Sulfat 15,433 min. (Detecció indirecta)

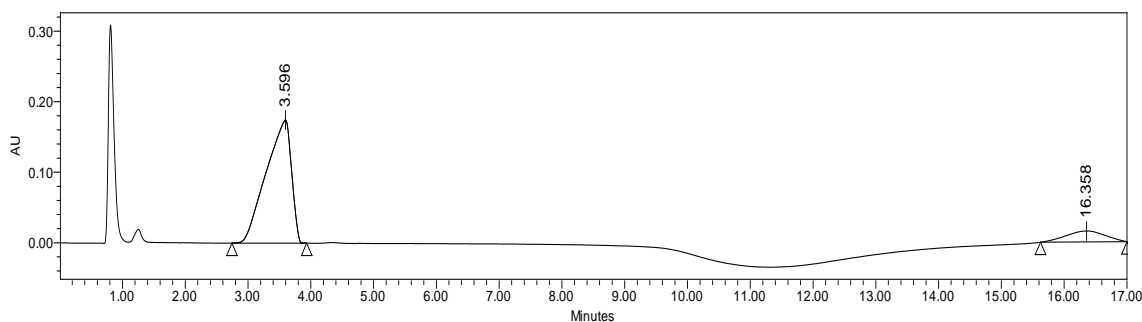


Fig. 51. Cromatograma d'una mostra d'àcid fòrmic adulterat amb àcid sulfúric. Pics: Formiat 3,596, Sulfat 16,358 min. (Detecció indirecta)

En resum:

- S'ha comprovat l'eficàcia de la cromatografia iònica en la detecció d'impureses salines en productes químics del sector adober.
- L'estudi de recuperació indica que el pretractament d'extracció en fase sòlida aplicat no produeix pèrdues d'anions.
- Els productes analitzats que presenten major contingut d'impureses salines són els colorants, amb valors totals de l'ordre del 60 % entre clorur i sulfat sòdic.
- En les mimoses estudiades no s'han detectat clorurs ni sulfats.
- Els olis estudiats tenen com a màxim un contingut total d'impureses del 1,4 % (clorur sòdic més sulfat sòdic).
- Les dues mostres de naftalensulfònics assajades contenen sulfats.

7.3. Quantificació d'àcids fòrmics comercials (detecció directa)

L'àcid fòrmic és àmpliament utilitzat en el sector adober. La possibilitat d'aplicar la cromatografia iònica a la determinació de formiats suposa un **avantatge** important perquè actualment l'anàlisi del contingut d'àcid fòrmic en mostres comercials es realitza volumètricament, i proporciona valors d'acidesa total. Només la cromatografia de gasos amb detector de masses permet l'anàlisi de l'àcid fòrmic, però actualment es tracta d'un sistema de detecció inaccessible econòmicament per a molts laboratoris. Per tant, és una novetat important disposar d'una tècnica analítica simple, tal com la CI amb detecció UV, per quantificar només el format en mostres d'àcid fòrmic comercial.

7.3.1. Mostres

Es van analitzar tres mostres d'àcid fòrmic comercial de concentracions 85,9 %, 85,5 % i 85,0 % (m/m) respectivament. Aquests valors de concentracions indicats a l'etiqueta van ser obtinguts per valoració àcid-base.

7.3.2. Mètode

Les mostres es van diluir perquè el contingut en anió format estigués dins l'interval de les rectes de calibratge.

De cada mostra es van preparar dos dilucions per aconseguir concentracions finals de l'ordre de 10 i 25 mg/L:

Es van pesar amb exactitud 0,25 g de mostra i es van enrasar amb aigua en matràs aforat de mig litre (dissolució A). La dissolució A es va diluir a 1:20 per aconseguir una concentració final de l'ordre de 25 mg/L, i també es va diluir a 1:50 (concentració final aproximada l'ordre de 10 mg/L).

Es van injectar per duplicat les mostres diluïdes utilitzant les condicions cromatogràfiques següents :

- Fase mòbil: 1mM en sulfat sòdic, 8% (V/V) de acetonitrilo i pH final $6,8 \pm 0,2$.
- Volum d'injecció: 20 µl.
- Flux: 0,9 mL/min
- Detecció: Directa amb PDA i recuperació del cromatograma a 202 nm per quantificar el format.
- Temperatura de la columna: 30°C

Les àrees es van interpolar en la recta de calibratge construïda en les mateixes condicions de treball (Taula 26 de l'apartat 5.5.6).

També es va injectar un patró de control de formiat per confirmar la identitat del pic en la mostra mitjançant comparativa dels temps de retenció i dels espectres del patró i del pic.

7.3.3. Resultats i conclusions

Els valors teòrics indicats a l'etiqueta (obtinguts per volumetria àcid-base) es comparen amb els experimentals determinats mitjançant cromatografia iònica (Taula 55). També s'ha calculat la diferència relativa entre l'acidesa total expressada com a àcid fòrmic i el contingut d'àcid fòrmic.

	Valor teòric. Acidesa total Volumetria, (% àcid fòrmic)	Valor experimental. Anió formiat. Cromatografia iònica, (% àcid fòrmic)	Diferència relativa (diferència absoluta/valor màxim)
Àcid fòrmic 1	85,9 %	83,0 %	3,38
Àcid fòrmic 2	85,5 %	84,6 %	1,05
Àcid fòrmic 3	85,0 %	83,4 %	1,88

Taula 55. Comparativa continguts àcid fòrmic (mètode volumètric i mètode cromatogràfic). Concentracions en % m/m

La Fig. 52 mostra el cromatograma obtingut en una de les mostres d'àcid fòrmic:

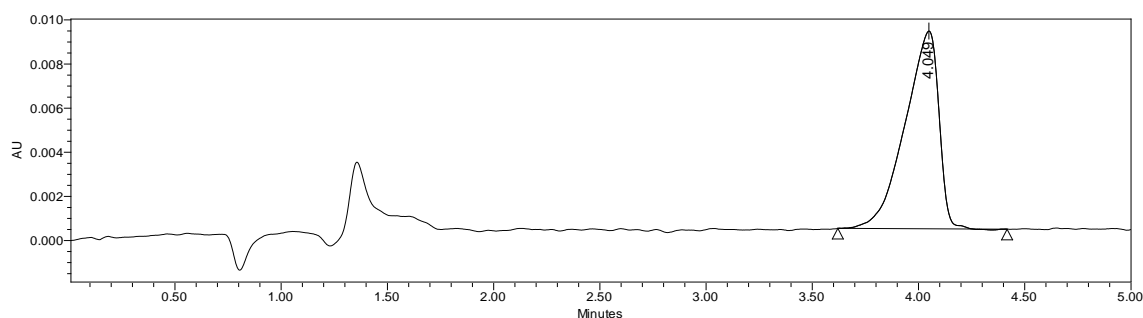


Fig. 52. Cromatograma d'una mostra d'àcid fòrmic comercial (detecció directa). Pic: Formiat 4,049 min

Els resultats exposats permeten extreure les següents conclusions:

- Els percentatges d'àcid fòrmic obtinguts amb la tècnica cromatogràfica són similars als valors teòrics de l'etiqueta.
- La cromatografia proporciona concentracions lleugerament inferiors als valors teòrics. Aquest fet és lògic perquè la cromatografia iònica només analitza l'àcid fòrmic, mentre que la valoració de neutralització determina l'acidesa total present en una mostra. El mètode volumètric està exposat a les interferències de les traces d'altres àcids, mentre que el cromatogràfic és específic de l'àcid fòrmic.
- Les diferències relatives són coherents: La literatura indica que diferències entre l'acidesa total i la riquesa en àcid fòrmic inferiors al 2 % no es consideren significatives. Poden atribuir-se a l'efecte combinat de la incertesa dels mètodes analítics i a la presència de diferents contaminants que en aquesta reduïda extensió no mereixen major atenció (1).

7.4. Aplicació del nou mètode amb detecció directa a la determinació de nitrats en aigües d'interès ambiental

La publicació de diversos articles a la premsa destacant l'excés de nitrats en el riu Anoia i en les xarxes de subministrament d'alguns municipis catalans (164-169) va motivar la realització d'aquest estudi. En alguns punts de mostreig es va arribar a superar de manera "constant" els nivells de nitrats establerts per la normativa vigent d'aigües potables (50 mg/L) (RD 140/2003).

Aquestes notícies van provocar un important impacte degut a l'elevada sensibilitat de la societat actual cap als temes sanitaris. Es coneix que hi ha grups de població molt sensibles als nitrats: persones amb gastritis crònica, nadons alimentats amb llet artificial i dones embarassades. L'excés de nitrats en aigües d'abastament és un indicador de la contaminació per nitrats de les aigües subterrànies, produïda en bona part per l'abocament de purins (residus de les granges de porcs) i lixiviats de fertilitzants i adobs emprats en els camps de conreu.

Es va realitzar un estudi per determinar si les indústries adoberes igualadines contribueixen a l'augment dels nivells de nitrats en les aigües del riu Anoia. Actualment les aigües residuals d'adoberia són tractades en l'EDAR de Vilanova del Camí i després abocades al riu Anoia. Es va comparar el contingut de nitrats en diferents punts del riu, abans i després de la depuradora, i en una font de la zona que està envoltada per camps de cereals. Les analítiques es van realitzar cromatogràficament, amb la fase mòbil sulfat sòdic. Es presenta un resum del treball realitzat.

7.4.1. Mostreig

Els dies 05/03/2010, 12/03/2010, 19/03/2010, 09/04/2010, 30/04/2010, 21/05/2010 i 04/06/2010 es van recollir mostres puntuals en els següents punts:

- Font Trobada, que emana al torrent de la Garrigosa, al costat del camí de la Font Trobada i envoltada de camps de cereals. Aquest punt no es veu afectat per l'activitat adobera.
- Riu Anoia al seu pas pel Molí Blanc. Punt de mostreig on no influeix l'acció adobera.
- Riu Anoia abans de la EDAR de Vilanova del Camí. Punt que tampoc es veu afectat per la indústria adobera.
- Riu Anoia després de la EDAR de Vilanova del Camí. Les aigües residuals de les indústries adoberes d'Igualada es tracten en l'estació depuradora de Vilanova del camí, i per tant, aquest és un punt de mostreig del riu que reflecteix l'acció de les indústries de la pell.

7.4.2. Mètode (detecció directa)

Les mostres es van diluir 3,5 vegades i es van cromatografiar 15 µL per duplicat recuperant el cromatograma a 210 nm i emprant com a eluent sulfat sòdic 1mM (pH final 6,6). Prèviament a la injecció es filtraren amb filtre de 0,45 µm.

Les àrees obtingudes per a cada mostra es van interpolar en la recta de calibratge construïda en les mateixes condicions de treball.

7.4.3. Resultats i conclusions

Els resultats, en mg/L de nitrats, es recullen a la Taula 56.

Punts de mostreig	Contingut de nitrats (mg/L)			
	Font Trobada	Riu Anoia		
Data	Font Trobada	Molí blanc	Abans depuradora	Després depuradora
05/03/2010	73,4	19,6	23,6	82,4
12/03/2010	26,8	27,1	21,2	38,2
19/03/2010	81,8	35,3	31,6	13,7
09/04/2010	80,4	33,5	26,5	35,9
30/04/2010	54,1	24,4	18,3	25,7
21/05/2010	86,1	25,0	23,3	41,5
04/06/2010	56,7	20,8	14,6	32,9

Taula 56. Contingut de nitrat (mg/L) en les mostres d'aigües analitzades

S'observa que totes les mostres de la Font Trobada, excepte la del dia 12/03/2010, van superar els valors de nitrats permessos per a aigües potables (50 mg/L). Aquest punt de mostreig no es troba influït per la indústria adobera. La contaminació per nitrats pot atribuir-se als fertilitzants provinents de l'activitat agrícola: la zona es troba envoltada per camps de cereals i probablement els llixiviats de fertilitzants han contaminat les aigües subterrànies.

Les mostres del riu Anoia en les zones no afectades per l'activitat d'adoberia (Molí Blanc i abans de la depuradora) presentaven baixos valors de nitrats i inferiors a 50 mg/L.

Les anàlisis de les mostres del punt del riu després de la depuradora també van proporcionar valors baixos de nitrats. Només hi ha un dia que va superar la concentració de nitrats de la Font Trobada (5/3/10).

En definitiva, es pot concloure que l'acció d'adobatge no produeix increments importants de nitrats en les aigües del riu Anoia.

S'ha comprovat que el nou mètode cromatogràfic desenvolupat, amb fase mòbil sulfat sòdic, és adequat per a aplicacions en gestió mediambiental.

7.5. Estudis d'intercomparació d'anàlisi d'aigües residuals (HPLC detecció indirecta)

Es va participar amb èxit en tres assajos d'aptitud adreçats a l'anàlisi d'aigües residuals i emprant la tècnica HPLC amb detecció UV indirecta amb la fase de biftalat potàssic 2 mM (condicions de la Taula 17). Els resultats van ser satisfactoris, en tots els casos es va obtenir un valor Z-score < 2, i suposen un recolzament a la metodologia desenvolupada en aquest projecte. (La puntuació Z-score s'ha explicat en el punt 4.4.2). La Taula 57 resumeix els paràmetres en què es va participar i indica les entitats organitzadores.

Entitat organitzadora	Data	Paràmetres en els que es va participar (CI amb detecció UV indirecta)
Laboratori Agroalimentari del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya (Programa Inter2000)	Març 2014	NO_3^-
Laboratori Agroalimentari del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya (Programa Inter2000)	Febrer 2015	NO_3^- , Cl^-
SETEL, S.L (Programa LEAP)	Abril 2016	NO_3^- , Cl^- , $\text{SO}_4^{=}$

Taula 57. Dades relatives als estudis interlaboratoris adreçats a l'anàlisi d'aigües

7.6. Aplicacions a altres sectors

La metodologia cromatogràfica proposada també esdevé adequada en la determinació d'anions en altres sectors, com ara el fitosanitari i el de la galvanotècnia. En aquest sentit, s'exposen les diverses aplicacions dutes a terme.

7.6.1. Nitrats en fertilitzants (amb fase mòbil sulfat sòdic, detecció directa)

Una de les anàlisis habituals en el sector fitosanitari és la determinació de nitrats en fertilitzants. En els laboratoris de la “Càtedra A3 Innovation in Leather” aquesta analítica es realitzava amb el mètode Kjeldhal amb reducció. Es tracta d'una metòdica força laboriosa, i per aquest motiu el mètode cromatogràfic suposa una alternativa al mètode tradicional Kjeldhal. Actualment, aquests laboratoris usen el nou procediment HPLC amb detecció directa com a alternativa al mètode tradicional, amb el conseqüent estalvi de temps tant en la preparació de la mostra com en la determinació.

7.6.2. Sulfats i fosfats en banys galvànics (detecció indirecta)

La tècnica HPLC amb detecció indirecta també es va aplicar a mostres de banys galvànics que requerien la determinació del contingut en sulfat i fosfat. Es va utilitzar l'eluent biftalat potàssic a concentració 2mM per prioritzar un menor temps d'anàlisi (condicions de la Taula 17).

Es van obtenir resultats satisfactoris. Es coneixia, segons la informació proporcionada per la empresa que va subministrar les mostres, que el contingut en fosfat dels banys havia de ser aproximadament el mateix que el de sulfat.

La mostra inicial es va diluir per tal d'assolir concentracions interpolables en les rectes de calibratge ja construïdes:

Es va pesar amb exactitud 4,0000 g del bany galvànic i es va diluir fins a 1 L. Una alíquota de la dissolució resultant es va portar a un matràs de 100 mL i es va enrasar. Una part d'aquesta darrera dilució es va cromatografiar, prèviament filtrada amb filtre de disc de 0,45 µm. El volum injectat va ser de 20 µL.

Els resultats finals, expressats en % en pes, van ser un 44,3% en sulfat i un 41,2% en fosfat.

7.6.3. Aplicació qualitativa del mètode en estudis de paleontologia

Una mostra curiosa analitzada va ser un fragment d'una pell de mamut subministrada pel museu del Mamut de Barcelona. Aquesta pell es va trobar a la Sibèria i data d'uns 10000 anys d'antiguitat. Suposadament no ha rebut cap tipus de curtició i podria haver-se autoadobat amb el seu propi greix. Es va aplicar la metodologia cromatogràfica amb detecció indirecta a l'extracte de pell i es va concloure que la pell contenia clorurs, sulfats i nitrats. Els resultats es van entregar al responsable de l'estudi paleontològic. El cromatograma obtingut es pot consultar a l'Annex 4.

7.7. Conclusions generals

Els resultats de les mostres estudiades en aquest capítol permeten concloure que la metodologia cromatogràfica desenvolupada, convenientment validada, és aplicable a productes químics del sector adober, a mostres d'interès ambiental i a mostres d'altres sectors. Les conclusions específiques de cada aplicació s'han detallat en l'apartat corresponent.

La possibilitat de determinar les impureses aniòniques mitjançant CI permetrà actualitzar el grau de coneixement sobre la presència de salinitat en productes d'adoberia.

La quantificació de formiat en mostres d'àcid fòrmic comercial suposarà una millora perquè fins ara aquesta determinació es realitzava mitjançant volumetria i s'obtenien valors d'acidesa total (fòrmic i impureses).

El nou procediment HPLC amb detecció directa és una bona alternativa al mètode tradicional Kjeldhal amb reducció per a l'anàlisi de nitrats en fertilitzants. Suposa estalvi de temps tant en la preparació de la mostra com en la determinació.

La participació en els assajos d'aptitud per a la determinació d'anions en mostres d'aigües residuals ha demostrat la validesa de la metodologia cromatogràfica amb detecció indirecta.

L'èxit d'aquestes proves exploratòries motiva futures aplicacions en l'anàlisi de nitrats en fertilitzats de diferents orígens, com per exemple els obtinguts a partir de residus de pells del sector adober.



Capítol 8. Determinació de crom hexavalent en pell per CI

8.1. Justificació i planificació de la investigació

Fins el 2017, la determinació de traces de cromo hexavalent en pells i en bens de consum de cuir es realitzava mitjançant la Norma ISO 17075:2007, basada en el mètode clàssic colorimètric de la difenilcarbazida. Aquest mètode presenta inconvenients i limitacions, tals com: laboriosa preparació de la mostra, elevada incertesa i possibles falsos positius degut a interferències (detallats als apartats 8.2 i 8.12.2).

La nova restricció imposada al Cr(VI) per la Comissió Europea i la seva aplicació des de l'1 de maig de 2015 van crear la necessitat de trobar un nou mètode alternatiu a la Norma ISO 17075:2007. El nou mètode ha de ser més ràpid i fiable que el colorimètric i ha de resoldre els inconvenients de l'esmentada norma.

Als apartats 1.1 i 2.5 s'ha justificat àmpliament l'interès en desenvolupar un mètode per determinar crom hexavalent en cuirs. També s'han explicat aspectes relacionats amb aquest anió: toxicitat, química del crom, importància del Cr(VI) en el sector adober, canvis normatius...

L'estudi que es presenta a continuació intenta satisfer aquesta nova necessitat. S'ha optat per la cromatografia iònica perquè és una excel·lent alternativa per a l'anàlisi de Cr(VI) en productes de cuir a causa dels avantatges propis de la tècnica cromatogràfica (apartat 3.1).

Aquest estudi ha participat activament en el Comitè Tècnic que redacta les propostes de nous mètodes ISO. Concretament ha participat en el grup de treball WG1 creat pel Comitè Tècnic CEN-TC 289 en col·laboració amb IULTCS, ISO i CEN amb la finalitat de que el mètode desenvolupat pogués ser aprovat com a Norma oficial EN-ISO. De fet, poc abans de dipositar-se aquesta tesi, ha estat publicada la nova norma ISO 17075-2:2017, basada en el mètode cromatogràfic desenvolupat.

L'esquema de la Fig. 53 resumeix les etapes que s'han dut a terme per al desenvolupament del nou mètode cromatogràfic.

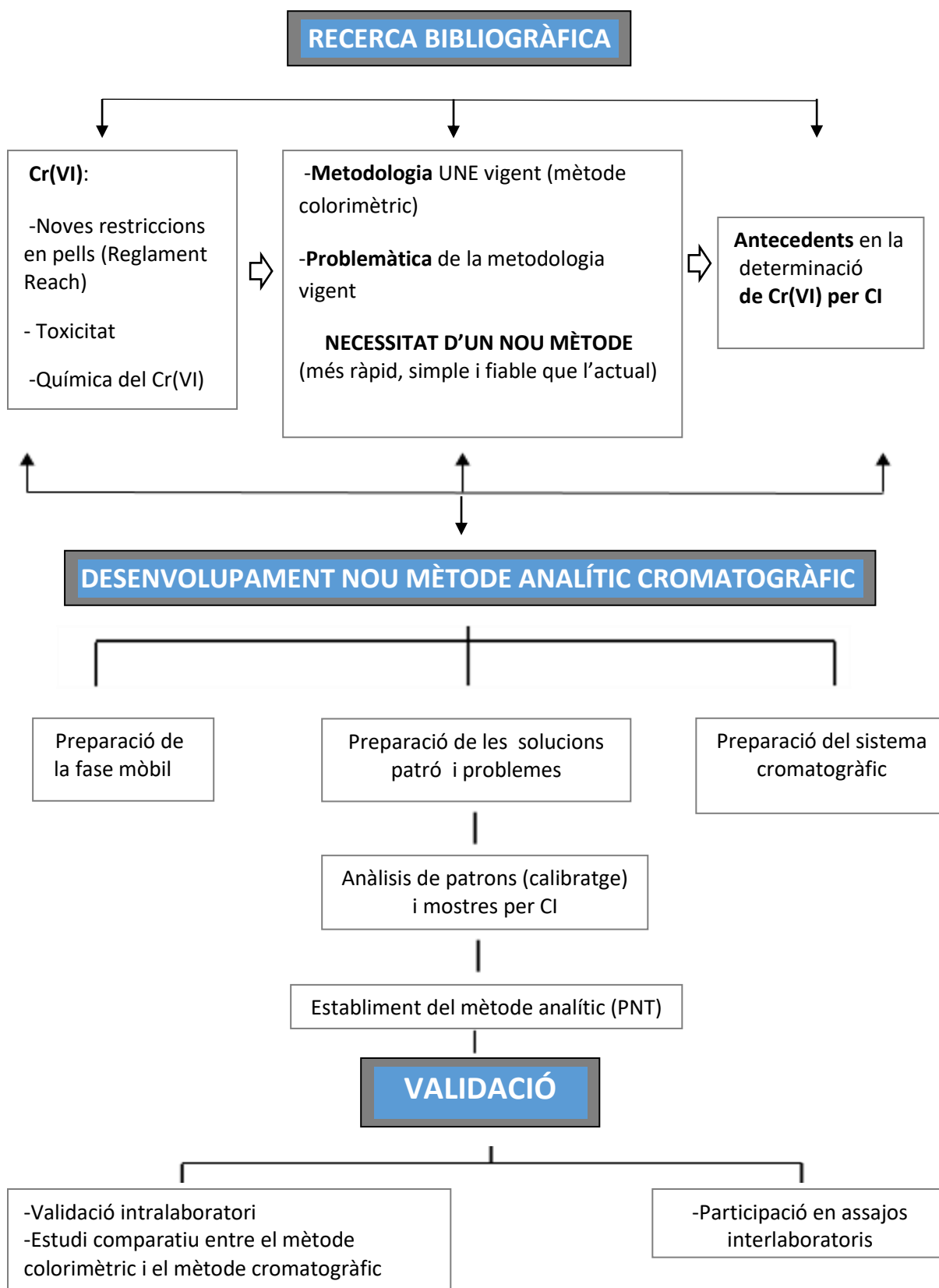


Fig. 53. Etapes del desenvolupament del mètode cromatogràfic per a la determinació de Cr(VI) en pells

8.2. Evolució i problemàtica del mètode analític per a la determinació del crom hexavalent en pell

El mètode d'anàlisi és de vital importància per quantificar de manera fiable el crom (VI) en pell. Els comitès d'anàlisi químics del cuir i els centres d'investigació han realitzat molts esforços en les darreres dècades per millorar aquest mètode analític. Originalment, la primera norma oficial per determinar el contingut de crom hexavalent en cuir va ser la DIN 53314:1996, publicada pel Deutsches Institut Fur Normungd, la qual és tècnicament igual a la IUC 18:1997. Aquest procediment es basa en la reacció entre la difenilcarbazida amb el crom (VI) extret del cuir i posterior quantificació del complex vermell-violeta per espectrometria UV-VIS a 540 nm (Fig. 54) (170,171).

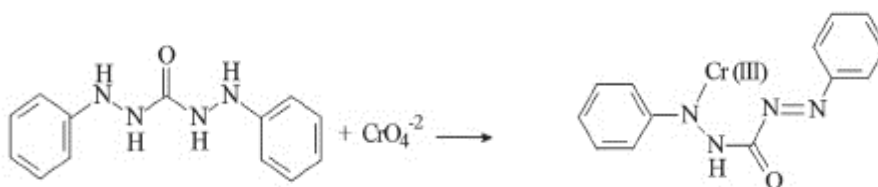


Fig. 54. Reacció entre la difenilcarbàzida i l'anió cromat

Posteriorment i degut a interferències i falsos positius que es van observar, principalment amb cuirs de color intens, el comitè CEN/TC 289 va presentar una millora en el mètode per eliminar aquestes interferències (va publicar-se la IUC 18:2003). (Les normes IUC 18 i la ISO 17075 són equivalents). Aquesta modificació va consistir en l'eliminació de colorants dissolts en els extractes de cuir fortament acolorits per extracció en fase sòlida, fet que va permetre la posterior determinació de crom (VI) amb el reactiu difenilcarbàzida en una solució decolorada. Aquest mètode d'anàlisi va ser adoptat com a norma ISO 17075:2007 i fins el 2017 ha estat l'únic mètode oficial existent utilitzat pels laboratoris d'inspecció i control de qualitat per a la determinació de crom hexavalent en cuir.

Les etapes bàsiques d'aquest procediment es troben resumides a la Taula 58 i a la Fig. 55.

- Mòlta** de la mostra d'acord amb la norma ISO 4044:2008
- Pesada** en baló de $2 \text{ g} \pm 0,010 \text{ g}$ de pell mòlta i **addició** de 100 mL de tampó de fosfat de pH 7,5–8. Aquest pH és adequat per evitar la reducció del crom hexavalent durant l'extracció i també per evitar l'oxidació del Cr(III).
- Desgasificació** durant 5 minuts amb corrent d'argó.
- Extracció** del crom VI soluble (en forma de cromat): 3 h a 50-60 rpm.
- Filtració al buit** amb filtre de $45 \mu\text{m}$
- En mostres acolorides: **Decoloració per extracció en fase sòlida** amb cartutx SPE.
- Desenvolupament** del color amb difenilcarbazida.
- Anàlisi espectrofotomètrica** a 540 nm.

Taula 58. Resum de les etapes de la determinació de crom hexavalent en pells segons la ISO 17075:2007

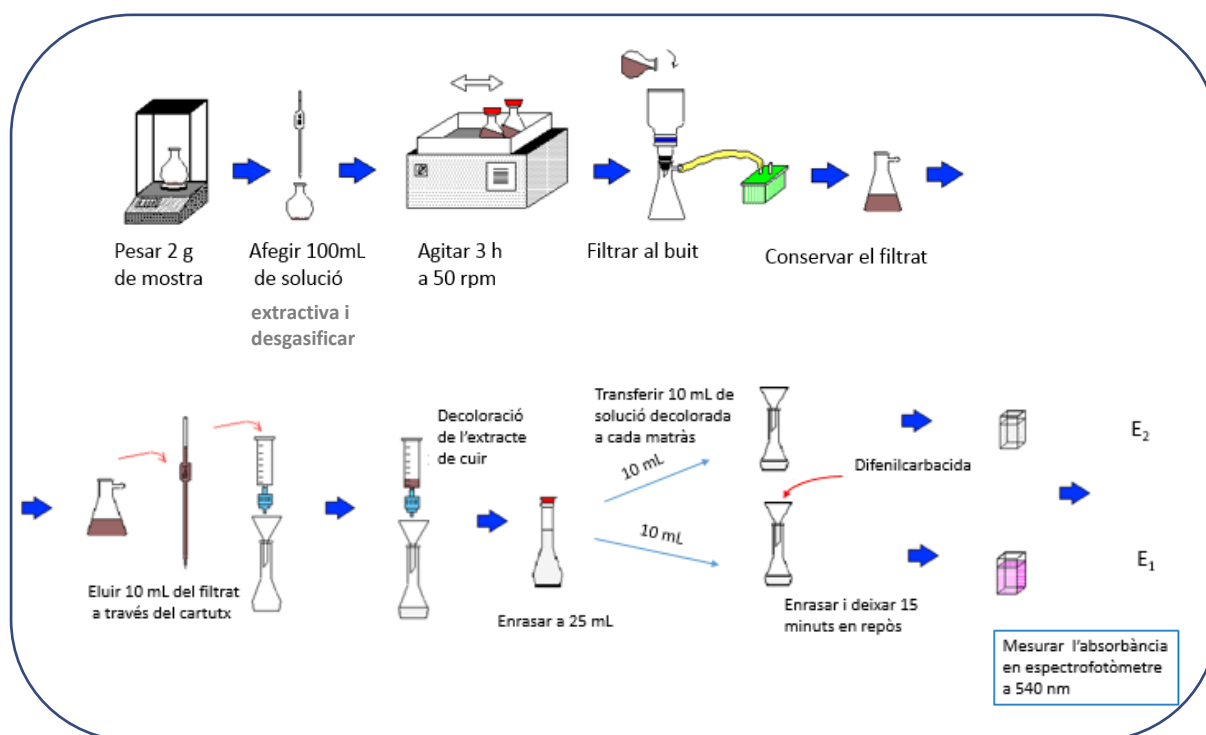


Fig. 55. Esquema del procediment de determinació de Cr(VI) en pell segons la ISO 17075:2007

En molts casos, la decoloració que es realitza amb SPE és eficaç; la Fig. 56 n'és un exemple.

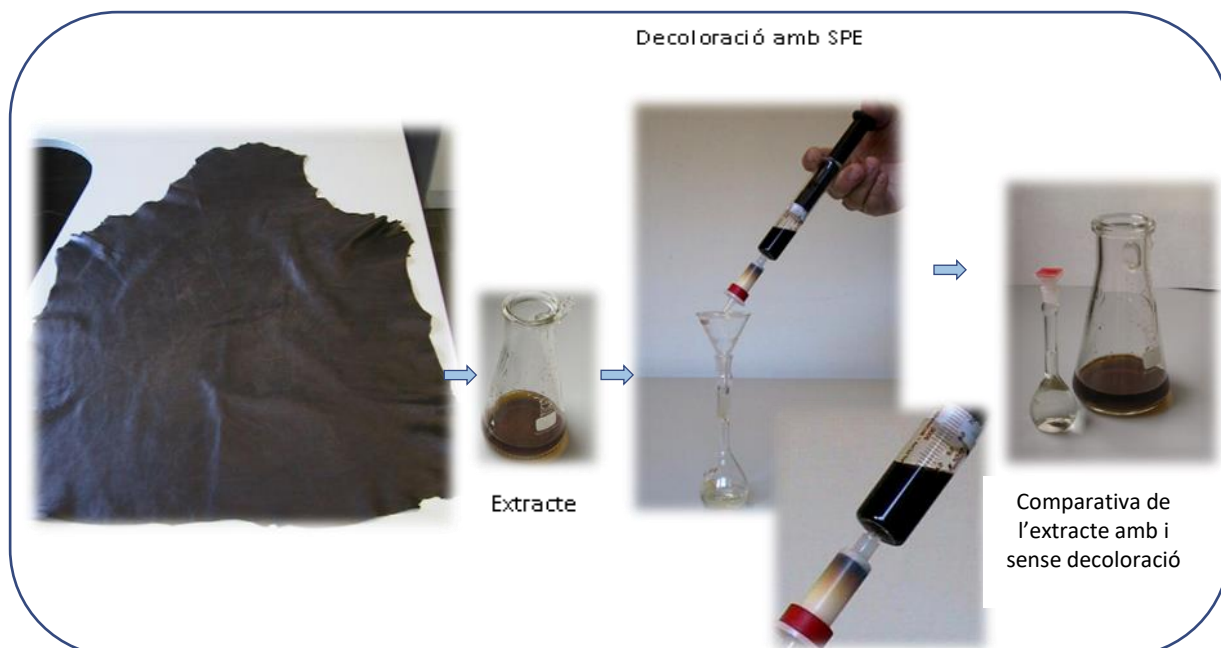


Fig. 56. Decoloració de l'extracte d'una napa negra mitjançant la tècnica d'extracció en fase sòlida amb cartutx SPE

Encara que el mètode fotolorimètric de la norma ISO 17075:2007 té l'avantatge de no requerir una inversió significativa en equipament i manteniment tècnic, també presenta una sèrie d'inconvenients importants: el cost dels consumibles és elevat (els cartutxos SPE són d'un sol ús); és un mètode poc robust (els resultats poden canviar de forma significativa en cas de no complir rigorosament les condicions del mètode); és una anàlisi que requereix molt de temps degut a que s'han de realitzar nombroses operacions manuals amb els extractes de cuir per eliminar les interferències de substàncies acolorides co-extretes amb el cuir. En conseqüència, la incertesa del mètode és alta; tot i que els tints dels extractes del cuir poden eliminar-se satisfactòriament per extracció en fase sòlida, altres substàncies co-extretes del cuir poden originar interferències desconegudes amb la difenilcarbazida, que en el cas de mostres amb baix nivell de crom (VI) poden ser suficientment importants per significar un fals positiu.

La Fig. 57 posa de manifest la dificultat que presenten alguns extractes de pell per ser decolorats: es mostren extractes diferents de quatre mostres de pell (erlenmeyers) i els mateixos extractes després d'haver estat sotmesos al procés d'extracció en fase sòlida (matrassos aforats). La imatge també permet apreciar l'aspecte final dels cartutxos i l'acoblament en sèrie d'aquests per millorar la decoloració.

S'observa que en l'extracte 1 no s'aconsegueix la decoloració ni amb dos cartutxos d'extracció en fase sòlida. Els altres extractes han requerit de dos a tres cartutxos SPE per aconseguir la decoloració.



Fig. 57. Extractes de quatre pells abans i després de la filtració SPE (erlenmeyers i matrassos aforats, respectivament) i aspecte dels cartutxos SPE després de la filtració

Així com s'ha comentat en l'apartat 1.1, diferents autors han proposat diverses tècniques d'anàlisi tals com l'espectrometria d'absorció atòmica, electroforesi capil·lar, redissolució i espectrofotometria d'injecció de flux per a determinar el crom hexavalent en pells, però no s'han adoptat com a mètode oficial pels comitès internacionals per diferents motius (manca de fiabilitat, lentitud, elevada inversió en equipaments, alta incertesa, entre d'altres). En definitiva, totes les normes oficials publicades fins l'any 2017 per a la determinació de crom hexavalent en adoberia es basaven en el mateix procediment que emprava la coneguda reacció amb la difenilcarbàcida.

Els centres d'investigació i comitès d'anàlisi de pell han dedicat molts esforços a la recerca d'un nou mètode alternatiu, que convenientment validat, pugui ser adoptat com a nou mètode oficial ISO conjuntament amb de la difenilcarbàcida. Aquest també ha estat el repte de l'actual capítol de la tesi. En aquest cas, s'ha escollit la tècnica cromatogràfica per a l'anàlisi de Cr (VI) en productes de cuir a causa dels avantatges propis de la tècnica, per la simplicitat del tractament de la mostra (aquesta s'injecta sense decolorar, Fig. 58) i altres millores que es detallaran al llarg del capítol.



Fig. 58. Vials amb extractes de cuir per ser injectats en el cromatògraf (no es necessària l'extracció amb cartutxos SPE per decolorar)

Paral·lelament a la recerca realitzada en aquesta tesi, un altre grup de treball del CEN s'ha ocupat de la revisió de les condicions d'extracció del Cr(VI) de la pell amb l'objectiu d'identificar les possibles causes que contribueixen a la pèrdua de fiabilitat en la IUC 18. En concret, han estudiat els següents factors:

- Influència del sistema de preparació de la mostra: desfibrat segons la norma ISO 4044:2008 versus desfibrat a tall amb tisores.
- Influència de la velocitat, temperatura i condicions d'agitació.

El mètode cromatogràfic que es desenvolupi en aquesta tesi, després d'incorporar les millores resultants de la revisió del procés d'extracció, està destinat a convertir-se en un nou mètode oficial ISO, conjuntament amb el de la difenilcarbazida un cop actualitzat. Aquesta situació serà comparable a la de la determinació del formaldehid en cuir, on coexisteixen dos normes internacionals ISO diferents, una cromatogràfica i una espectrofotomètrica.

La Fig. 59 mostra un resum de l'evolució cronològica de les normes oficials per a la determinació de crom hexavalent en cuir.

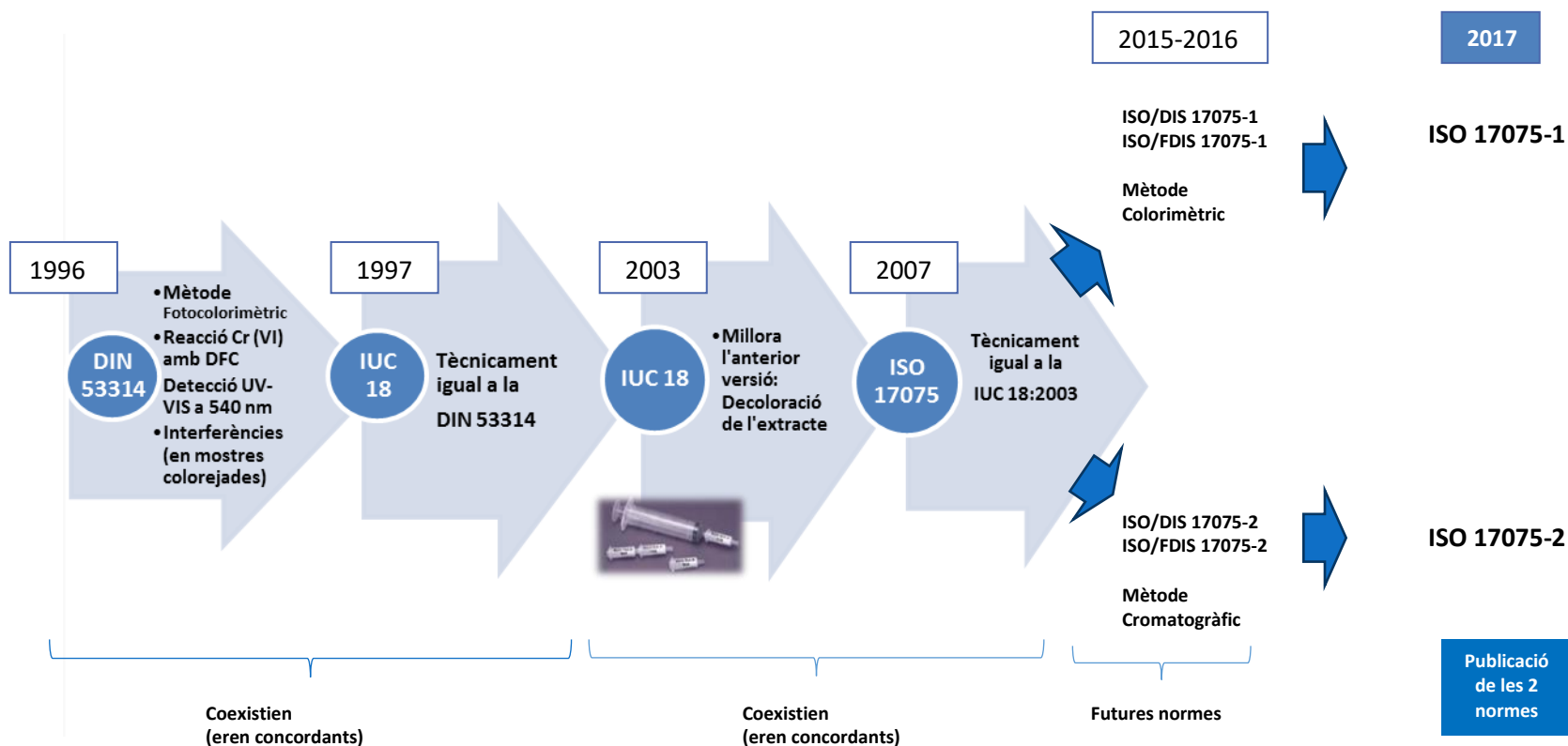


Fig. 59. Evolució cronològica de les normes oficials per a la determinació de crom hexavalent en cuir

8.3. Objectius

L'**objectiu general** d'aquest estudi és desenvolupar un nou mètode, basat en la cromatografia d'intercanvi iònic, per dur a terme la determinació de crom (VI) en cuirs i que pugui ser aprovat com a Norma oficial EN-ISO. El nou mètode ha de ser més simple, ràpid i fiable que el mètode colorimètric oficial (ISO 17075:2007) i ha de permetre resoldre els inconvenients del mètode fotolorimètric explicats a l'apartat anterior. Igualment ha de complir amb el límit de quantificació establert per la comissió europea perquè pugui convertir-se en futura norma.

Per aconseguir aquest objectiu general serà necessari assolir els següents **objectius específics**:

1. Seleccionar les condicions experimentals del nou mètode cromatogràfic.
2. Elaborar les rutines del treball cromatogràfic (temps d'equilibrat, precaucions i manteniment del sistema cromatogràfic).
3. Redactar el PNT per a la determinació de Cr(VI) per Cl.
4. Aplicar el nou mètode cromatogràfic a tot tipus de matrius de cuir i complements de forma comparativa amb la norma ISO 17075:2007 (mètode de la difenilcarbazida) per obtenir dades d'exactitud, precisió i capacitat productiva.
5. Validar el nou mètode HPLC de forma interna i amb la participació en assajos interlaboratoris nacionals i internacionals.
6. Participar en el Comitè Tècnic que redacta les propostes dels nous mètodes ISO.
7. Difondre el nou mètode cromatogràfic i els seus avantatges.

En relació a l'assoliment dels objectius al llarg de la investigació, cal destacar el següent:

-Els cinc primers objectius s'assoliran cronològicament, en el mateix ordre que estan redactats.

- L'objectiu quatre permetrà una validació interna de la nova metodologia.

- Els objectius sis i set s'atendran al llarg de tot l'estudi. La investigació que es presenta en aquest capítol participa en el grup de treball creat pel Comitè Tècnic CEN-TC289 en col·laboració amb IULTCS, ISO i CEN.

-La recerca es centrarà en l'aplicació de la tècnica cromatogràfica, com a nou sistema de mesura, per a la determinació del crom hexavalent en pells. El nou mètode aportarà la innovació de substituir la determinació colorimètrica del derivat crom-difenilcarbazida (ISO 17025:2007) per la determinació directa del ió cromat per la cromatografia d'intercanvi iònic.

-Les etapes de mostreig i extracció del crom es duran a terme segons les normes ISO 4044:2008 i ISO 17075:2007 respectivament, sense cap modificació.

-En alguns apartats, com en el de selecció de les condicions experimentals, s'explicaran simultàniament el procediment i els resultats per facilitar la comprensió degut al fet que els resultats obtinguts en algunes proves condicionaven els assajos posteriors.

8.4. Instrumental, materials i reactius

INSTRUMENTAL I MATERIAL

-Els següents equips, descrits a l'apartat 5.2: cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC) amb la columna de separació i quantificació d'anions, pH-metre, espectrofotòmetre VIS-UV.

-**Agitador orbital** amb programador, de $100 \pm 10 \text{ min}^{-1}$.

- **Matràs erlenmeyer** de 250 mL, amb tap. Per realitzar l'extracció.

- **Tub d'aireació amb adaptador esmerilat** per desgasificar.

- **Filtres de membrana, amb tamany de porus de 0,45 μm :**

-**Filtres de membranes de fibra de vidre** de 0,45 μm per filtrar l'eluent (Millipore HAWP04700).

-**Filtres de membrana de fibra de nylon** de 0,45 μm per filtrar l'extracte (SARTOLON POLYAMID 25006 47 N de la casa comercial Sartorius).

-**Equip de filtració al buit**

- **Molí** (per desfibrar la mostra segons norma ISO 4044:2008).

- **Filtres de xeringa de nylon** de 0,45 μm .

-**Xeringa** de 10 mL con conus luer de vidre.

- **Vials per HPLC** amb tap pre-slit.

REACTIUS

Tots els reactius utilitzats tenen al menys puresa analítica.

- **Solució d' àcid fosfòric:** Dissoldre 700 mL d'àcid o-fosfòric, $d=1,71 \text{ g/mL}$, en aigua UP fins a 1L.

- **Solució d'extracció:** Dissoldre 22,8 g d'hidrogen fosfat de dipotassi, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, en 1000 mL d'aigua UP, i ajustar el pH amb la dissolució d'àcid fosfòric a pH $8,0 \pm 0,1$. Es desgasifica passant una corrent d'argó o nitrogen durant 4 minuts.

NOTA ORIENTATIVA: Generalment, en la preparació d'1 L de solució d'extracció, el pH abans d'ajustar és aproximadament de 9,4 i es requereixen unes 14-18 gotes d'àcid fosfòric per assolir el pH de $8,0 \pm 0,1$.

-Sulfat amònic anhidre

- **Solució mare de 1000 mg/L de crom (VI):** Pesar 2,829 g de dicromat potàssic (assecat durant $16\text{h} \pm 2\text{h}$ a $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) en un vas de precipitats i dissoldre en aigua UP. Transferir a un matràs aforat de 1000 mL i enrasar amb aigua UP. Aquesta solució té una concentració de 1000 mg Cr (VI)/L (1mL d'aquesta dissolució conté 1 mg de crom).

- **Solució patró de 1,00 mg/L de crom (VI):** Pipetejar 1mL de solució mare (1000 mg Cr (VI)/L) i transferir a un matràs aforat de 1000 mL i enrasar con solució d'extracció. Aquesta solució té una concentració de 1 mg Cr (VI)/L.

-**Argó, lliure d'oxigen**, com a gas inert per desgasificar.

-**Aigua ultrapura (Aigua UP)** obtinguda pel procés Milli-Q de Millipore.

- **Dicromat potàssic ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)**, assecat durant $16\text{h} \pm 2\text{h}$ a $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- Hidròxid sòdic

- **Solució mare d'eluent (250 mM en sulfat amònic):** Pesar 33 g de sulfat amònic en un vas de precipitats i dissoldre en aigua UP. Pesar 0,4 grams d'hidròxid sòdic en un altre vas de precipitats i dissoldre en aigua UP.

Transferir el contingut dels dos gots anteriors a un matràs aforat de 1 L i enrasar amb aigua UP. El pH d'aquesta dissolució és de 8,2 i la seva concentració 250 mM en sulfat amònic i 10 mM en hidròxid sòdic. A partir d'aquesta solució es prepara l'eluent o fase mòbil.

- **Eluent fase mòbil (25 mM en sulfato amònic):** Pipetejar 100 mL de la solució mare d'eluent i transferir-los a un matràs aforat de 1 L. Enrasar amb aigua UP. Comprovar que el pH d'aquesta dissolució es $8,0 \pm 0,2$. Filtrar amb membrana de fibra de vidre de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore HAWP04700).

Precaució: El matràs on es prepara l'eluent ha d'estar net. NO reomplir el matràs que ja ha contingut fase mòbil.

8.5. Selecció dels paràmetres experimentals cromatogràfics

Es van realitzar diverses proves preliminars per **seleccionar els paràmetres experimentals** i **elaborar rutines** d'equilibrat, de seqüenciació d'injeccions i de manteniment del sistema cromatogràfic.

Els protocols de manteniment del sistema cromatogràfic serviran de suport als laboratoris que implementin el nou mètode. Aquest treball pretén apropar la nova metodologia cromatogràfica als laboratoris del sector del cuir.

Els paràmetres cromatogràfics objecte d'estudi han estat: composició de la fase mòbil, condicions de detecció i volum d'injecció. S'argumenta la selecció de les esmentades condicions experimentals.

No es van investigar la temperatura de la columna ni el flux de l'eluent perquè ja es van considerar en l'apartat 5.4.6. L'experiència adquirida al llarg de la tesi permet escollir una temperatura de 30°C i un flux de 0,9 mL/min.

S'expliquen simultàniament el procediment i els resultats per facilitar la comprensió (els resultats obtinguts en algunes proves condicionaven els assajos posteriors).

8.5.1. Fase mòbil

La correcta elecció de la fase mòbil és decisiva per a l'èxit de l'anàlisi. Cal considerar el tipus d'electròlit i la seva concentració, el pH i el solvent. També s'avalua l'estabilitat de la fase mòbil, ja que és un aspecte pràctic interessant per als laboratoris que adoptin aquesta nova metodologia per a la determinació del crom hexavalent.

La composició de la fase estacionària condiona i limita els components de la fase mòbil, com ja s'ha explicat a l'apartat 5.4.2.

Per seleccionar la **composició** més adequada de l'eluent es van tenir en compte diversos **aspectes**:

- a) **Interessa** una fase mòbil que proporcioni **un temps de retenció baix** per al cromat perquè així les anàlisis siguin més ràpides i els pics més fàcils d'integrar. És ben conegut que els temps de retenció més llargs originen pics més amplis, menys esvelts i difícils d'integrar. En conseqüència, en cromatografia iònica es prefereix treballar amb temps de retenció curts.
- b) **Les fases mòbils concentrades poden produir precipitacions** de sals en el sistema cromatogràfic. Una de les limitacions de la columna emprada és que no permet concentracions salines superiors a 0,1 M.
- c) La **finalitat de l'acetonitril** en la fase mòbil és **disminuir la viscositat** i actuar com a **bactericida**, tal i com es va explicar a l'apartat 5.4.2. La columna iònica utilitzada requereix eluents amb **menys del 12 % en acetonitril**.
- d) Sempre que sigui possible, es prefereix una **fase mòbil econòmica i de fàcil preparació**.

Per decidir l'**electròlit** a emprar es va fer una **recerca a la literatura** dels eluents utilitzats per altres autors en la determinació de crom hexavalent per cromatografia iònica en diferents mostres analítiques. També es van consultar les recomanacions de cases comercials especialitzades en cromatografia i es van mantenir comunicacions via correu electrònic amb els tècnics de la casa comercial fabricant de la columna cromatogràfica emprada en aquest estudi (Waters). Els resultats d'aquesta recerca bibliogràfica es troben recollits a l'apartat 3.7.3 i resumits a la Taula 9 del mateix apartat. Després de valorar tota la informació recopilada es decideix treballar amb sulfat amònic com a electròlit. El sulfat amònic és un eluent fort. Sulfat i cromat tenen una afinitat molt similar en intercanviadors aniònics de base forta. Degut a l'elevada conductivitat del sulfat, no pot emprar-se en la detecció cromatogràfica conductimètrica. Però aquest fet no és un problema perquè la detecció que s'utilitzarà és la UV directa. L'eluent sulfat amònic també compleix uns requisits importants: no absorbeix a les longituds d'ona de màxima absorció de l'anió cromat (274 i 372 nm) (Fig. 61 de l'apartat 8.5.2), té comportament amortidor de pH i és el que proporciona menors temps de retenció dels consultats a la literatura, (Taula 9).

Atès que el Cr(VI) és molt més estable a pH bàsics, es fa imprescindible emprar una fase mòbil alcalina. Concretament es decideix un pH de l'eluent de $8,0 \pm 0,2$ perquè aquest és el valor de pH de la solució extractiva emprada per a extracció del crom hexavalent de la pell segons la norma ISO 17075:2007. En aquestes condicions de pH el crom hexavalent es troba com a anió **cromat**.

Es va estudiar la **influència de diferents composicions de l'eluent** en el cromatograma a través de l'assaig de cinc concentracions diferents de sulfat amònic compreses entre 2,5 i 50 mM, amb un 8% (V/V) d'acetonitril i pH final $8,0 \pm 0,2$ ajustat amb dissolució 0,5 M en NaOH. Aquesta proporció d'acetonitril ja va funcionar bé en altres determinacions aniòniques. No es van assajar concentracions superiors de sulfat amònic degut a la limitació de la columna cromatogràfica (apartat 5.4.2). Els eluents es van preparar per dilució d'una solució mare de sulfat amònic 250 mM i ajustant el pH de la dissolució final al valor $8,0 \pm 0,2$ amb hidròxid sòdic 0,5 M. Finalment es filtraven amb filtre de $0,45 \mu\text{m}$. S'injectaren per duplicat 20 μL d'un patró de 0,1 ppm de Cr(VI) (equivalent a 5 mg Cr(VI)/kg pell). La temperatura de la columna va ser $30 \pm 1^\circ\text{C}$ i el flux 0,9 mL/minut. Els cromatogrames es van capturar a 372 nm.

La Taula 59 mostra els temps de retenció obtinguts amb cada un dels eluents i la Fig. 60 representa la variació del temps de retenció del pic de cromat en funció de la concentració de fase mòbil.

Fase mòbil	Temps de retenció del pic de cromat (minuts)
2.5 mM en sulfat amònic i 8% ACN	>10
10 mM en sulfat amònic i 8% ACN	6,7
25 mM en sulfat amònic i 8% ACN	3,6
25 mM en sulfat amònic (sense ACN)	3,4
50 mM en sulfat amònic i 8% ACN	2,5

Taula 59. Temps de retenció obtinguts amb els diferents eluents assajats

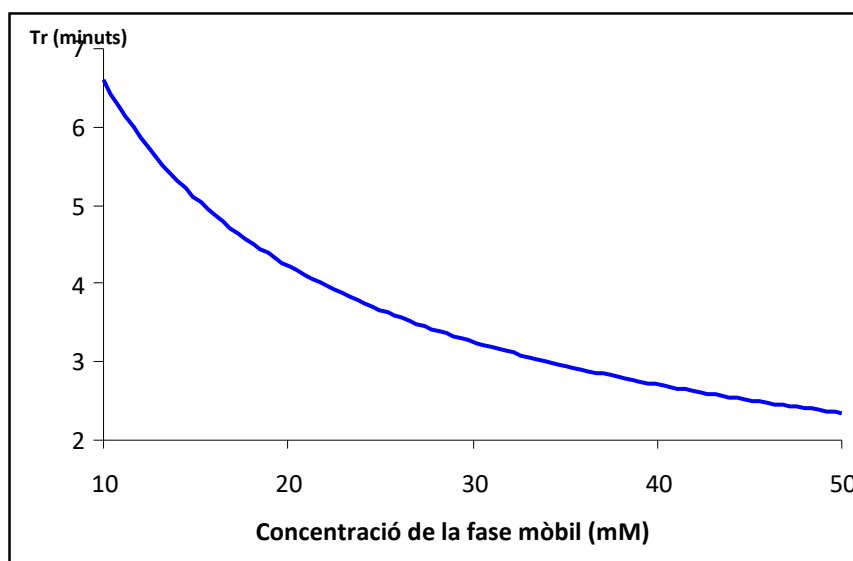


Fig. 60. Temps de retenció del pic del cromat en funció de la concentració de la fase mòbil (8% ACN en tots els casos)

S'evidencia que la concentració del contraió en la fase mòbil afecta la retenció dels ions de la mostra: concentracions més elevades de sulfat amònic originen més competència i desplacen l'anió cromat de la fase estacionària, proporcionant menor retenció.

Es va descartar la concentració 10 mM perquè proporciona temps de retenció superiors i pics menys esvelts (més difícils d'integrar).

Es recomana doncs, treballar a una concentració d'eluent compresa entre 25 i 50 mM. Per decidir el valor de concentració més adequat es van construir rectes de calibratge i es van determinar límits de detecció:

- Es va comprovar que concentracions de sulfat amònic compreses dins l'interval 25-50 mM no afecten la linealitat de l'equació de la corba de calibratge: en tots els casos s'obtenen valors de r superiors a 0.9998.

- Concentracions de 25 i 50 mM de l'eluent van proporcionar valors de LOD del mateix ordre (a través d'injeccions d'un patró de 0,1 ppm en Cr(VI)).

Amb la finalitat d'equilibrar un temps de retenció baix i una fase mòbil no massa concentrada (que minimitzi el risc de precipitació de sals en el sistema), es prefereix

una concentració de fase mòbil 25 mM. A més, un altre avantatge que aporta la concentració 25 mM és que no requereix ajust final del pH perquè un cop enrasada la dissolució ja presenta un pH de $8,0 \pm 0,2$.

D'altra banda, també es van comparar els temps de retenció dels pics de cromat obtinguts amb la fase mòbil 25 mM amb i sense acetonitril. Es va comprovar que l'eluent amb acetonitril proporcionava un temps de retenció lleugerament superior

A l'apartat 5.4.2, en la selecció del solvent, ja s'ha explicat que la finalitat de l'acetonitril en l'eluent és disminuir la viscositat i actuar com a bactericida. També s'han exposat les recomanacions de diferents autors sobre el contingut d'ACN i el període de venciment de la fase mòbil. Tot i que les solucions de sulfat d'amoni són no volàtils i presenten un pH estable en el temps, es va valorar el risc de creixement microbià per decidir si era necessari addicionar l'acetonitril. Aquesta valoració es va fer mitjançant el següent **estudi d'estabilitat**:

- Es van introduir 80 mL de fase mòbil 25 mM en sulfat amònic en un recipient de vidre amb tap hermètic.
- En un altre recipient de vidre idèntic a l'anterior es van introduir 80 mL de fase mòbil 25 mM amb 3% de ACN
- Ambdós recipients tancats es van mantenir a 26°C en un armari termostàtic durant sis setmanes.
- Es va valorar visualment l'aspecte de les dues fases mòbils (setmanalment i al cap de 6 setmanes). La detecció visual del creixement microbià es basa en observar la transparència o enterboliment del medi líquid: si el medi líquid és transparent indica que no hi ha creixement i l'enterboliment del medi és un indicador de creixement microbià.

Es va determinar visualment que durant aquest període de temps cap de les dues fases mòbils estudiades presentava enterboliment.

Considerant que el desenvolupament de la part experimental d'aquest capítol requeria múltiples determinacions diàries de Cr(VI) i el consum d'eluent seria elevat, es decideix no afegir acetonitril. De manera orientativa, el consum de fase mòbil ha estat d'uns 170 mL diaris. Es preparaven 500 mL de fase mòbil cada tres dies (temps insuficient perquè es produís atac microbià).

Com a **conclusió**, es fan les següents propostes:

- Treballar a concentracions de fase mòbil **25 mM** en sulfat amònic (pH $8,0 \pm 0,2$).
- **No** incorporar **acetonitril** a la fase mòbil, tot i que és recomanable un 8% d'acetonitril per a una millor conservació de l'eluent.
- Com a precaució, establir un **període de caducitat de l'eluent 25 mM d'una setmana** (per evitar risc de creixement bacterià).
- **Preparar l'eluent en un matràs net**. No reomplir el matràs que ja ha contingut fase mòbil la setmana anterior (pot contenir restes de solució al fons del matràs).
- Adoptar un període de venciment de la solució mare d'eluent (250 mM en sulfat amònic) d'un mes i conservar-la en flascó de polietilè a 4°C.

La fase mòbil 25 mM en sulfat amònic i pH $8 \pm 0,2$ compleix els aspectes que es van marcar al principi d'aquest apartat com a criteris de selecció: baix temps de retenció, baixa concentració salina, econòmica i de fàcil preparació.

8.5.2. Condicions de detecció: longitud d'ona i interval de registre de l'espectre

Per determinar la longitud d'ona de captura del cromatograma es va registrar l'espectre d'absorció de l'anió cromat. Es va obtenir l'espectre d'un patró de 1 ppm en Cr (VI), preparat amb l'eluent 25 mM en sulfat amònic com a dissolvent (Fig. 61). Com a blanc de l'espectrofotòmetre es va emprar la fase mòbil, per tal d'intentar simular les condicions en què el cromatògraf registra l'espectre del cromat: el crom hexavalent, en forma d'anió cromat, és eluït amb sulfat amònic 25 mM.

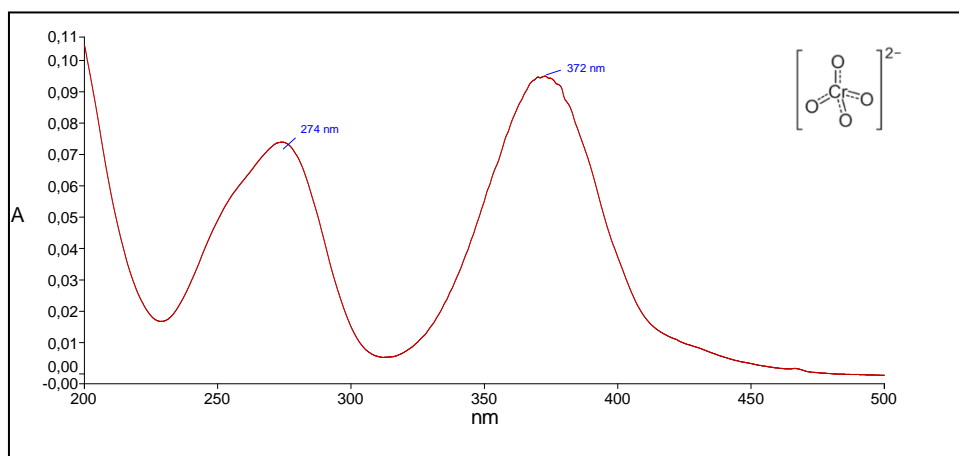


Fig. 61. Espectre UV de l'anió cromat dissolt en fase mòbil

En espectrofotometria està comprovat que quan es desitja la més alta sensibilitat s'ha de seleccionar una longitud d'ona corresponent a un pic màxim. L'anió cromat absorbeix en gran mesura en la regió UV. S'observen dues bandes fortes a 274 i a 372 nm respectivament. En conseqüència, ambdues longituds d'ona són adequades per la detecció UV directa del pic de cromat (ni el fosfat de la solució extractiva que s'emprarà en l'extracció del crom de la pell, ni el sulfat de l'eluent absorbeixen en la regió UV).

El detector de fotodíodes permet la confirmació fiable de la identitat de cromat per comparació de l'espectre UV del pic detectat amb l'espectre estàndard de cromat. Es decideix emprar la longitud d'ona de 372 nm perquè a aquest valor pocs components aniònics, dels que hipotèticament poden ser co-extrets de la mostra de cuir, mostren absorbàncies significatives. Típicament, els anions orgànics tenen baixa absorbància a la longitud d'ona de 372 nm. Per altra banda, aquests anions orgànics presenten menor afinitat en intercanviadors forts d'anions i elueixen abans. També s'ha comprovat que les substàncies aniòniques inorgàniques amb absorció a l'UV, com el bromur, nitrit, nitrat, no interfereixen amb el pic del cromat en el cromatograma a 372 nm. D'altra banda, l'addició de Cr(VI) a diferents extractes de pell sempre ha originat l'aparició d'un únic pic en el cromatograma, el pic del cromat.

Efecte de la concentració de crom hexavalent en espectre UV registrat pel cromatògraf

Es va observar que diferents concentracions de crom feien variar lleugerament els valors de longitud d'ona de màxima absorció en els espectres proporcionats pel detector de fotodíodes. Aquest fet és degut bàsicament a efectes de soroll. Per valorar-ho es van comparar cromatogrames a 372 i a 370 nm de diferents concentracions de Cr(VI) (0,02, 0,05 i 0,2 ppm) i es van construir rectes de calibratge a ambdues longituds d'ona. Les rectes es van assajar a amb la fase mòbil 50 mM i 25 mM en sulfat amònic. Les figures Fig. 62 i Fig. 63 mostren cromatogrames superposats a les dues longituds d'ona. S'observa que els cromatogrames recuperats a 372 nm presenten menys soroll.

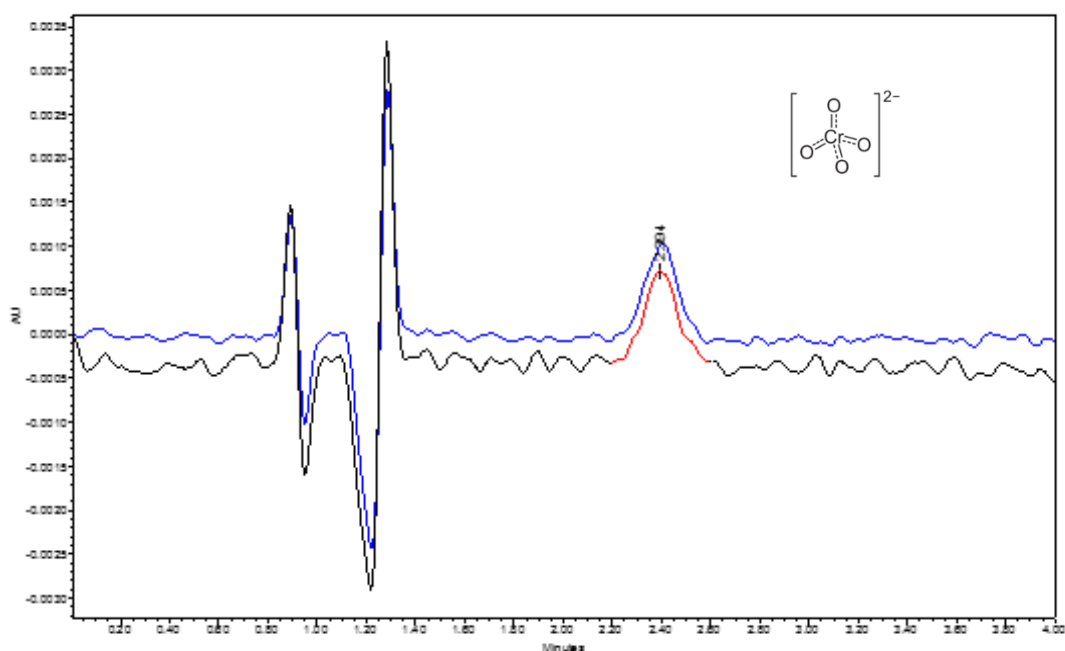


Fig. 62. Comparativa de cromatogrames de dissolució de 0,05 mg/L Cr(VI) en sulfat amònic 25 mM: blau (372 nm), negre (370). (Vinj 20 μ L)

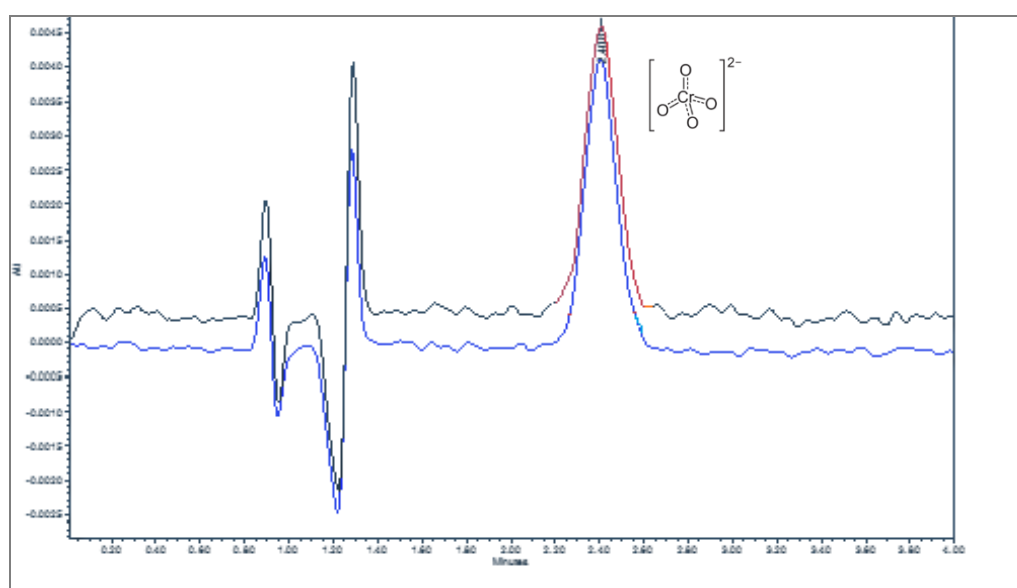


Fig. 63. Comparativa de cromatogrames de dissolució de 0,2 mg/L Cr(VI) en sulfat amònic 25 mM: blau (372 nm), negre-vermell (370). (Vinj 20 μ L)

Les rectes de calibratge a 372nm i a 370nm es van construir amb els mateixos patrons. En les dues concentracions de fase mòbil es va comprovar la superposició de les rectes i la bona linealitat a 372 i a 370 nm dins l'interval de 0,02 a 0,6 mg/L de Cr(VI) (coeficients de correlació superiors a 0,9998) (Fig. 64). Tot i que les diferències

són mínimes, s'observa un millor coeficient de correlació i una major sensibilitat (pendent de la recta) a 372 nm.

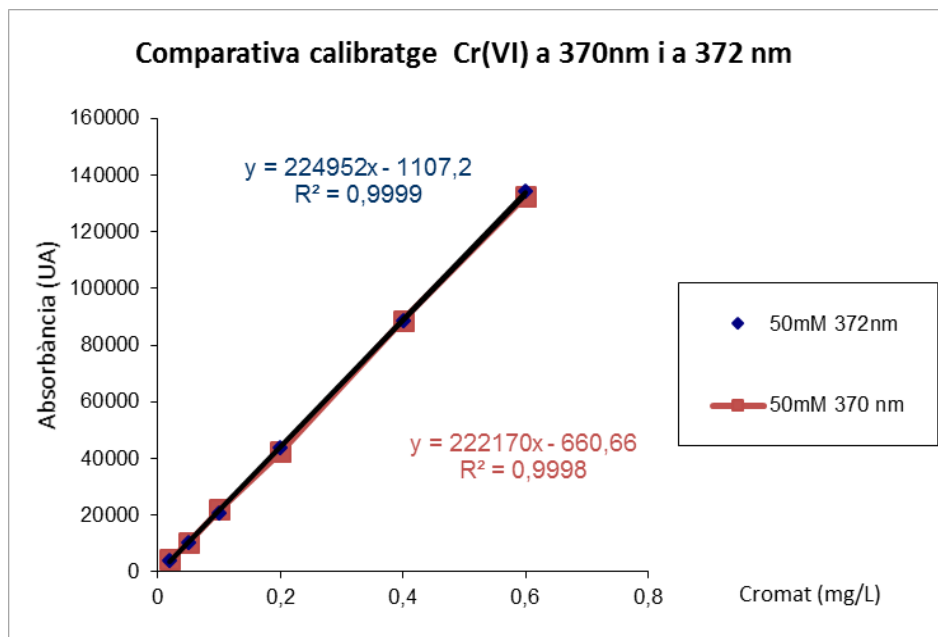


Fig. 64. Comparativa de les rectes de calibratge de crom hexavalent a 370 nm i 372 nm. (Volum d'injecció 40 µL, fase mòbil 50 mM en sulfat amònic)

En resum, es decideix:

- Recuperar els cromatogrames a **372 nm** perquè aquesta longitud d'ona proporciona línies de base més planes i una bona recta de calibratge.
- Registrar els espectres UV en el cromatògraf en **l'interval de 200 a 550 nm**.

8.5.3. Volum d'injecció

En les proves preliminars realitzades amb patrons de Cr(VI) s'han injectat 20 µL. Al llarg de la tesi el volum d'injecció màxim utilitzat fins ara, amb altres anions, ha estat de 40 µL.

En la determinació Cr(VI) es va plantejar injectar un volum elevat que, sense afectar la resolució, millorés al màxim la sensibilitat.

Com s'ha explicat a l'apartat corresponent a la determinació d'anions amb detecció indirecta, es va consultar al departament tècnic del fabricant de la columna sobre el

volum màxim permès. Arrel d'aquesta consulta es va establir un volum màxim de 62,5 µL. El raonament i els càlculs es troben al punt 5.4.6.

Considerant aquesta informació, es va fer un estudi sobre la influència del volum d'injecció en el pic de cromat i en el límit de detecció (LD). Es van injectar per quadruplicat diferents volums (50, 75 i 100 µL) d'un patró de 0,0502 mg/L de Cr(VI) enrasat amb solució extractiva i es va calcular el LD de conformitat amb l'apartat 4.3.3. Les condicions cromatogràfiques van ser les definides en els apartats anteriors (sulfat amònic 25 mM com a eluent, longitud d'ona de 372 nm, registre d'espectre en l'interval 200-550 nm i temperatura de la columna de 30 °C). La Taula 60 presenta els resultats.

Vinj (µL)	Temps retenció (min)	Mitjana Tr	RSD (%)	LD (mg/L)	Mitjana LD	RSD (%)
50	3,287	3,289	±0,2753	0,01060	0,012	±15
	3,296			0,01380		
	3,277			0,01090		
	3,296			0,01390		
Vinj (µL)	Temps retenció (min)	Mitjana Tr	RSD (%)	LD (mg/L)	Mitjana LD	RSD (%)
75	3,278	3,279	±0,1613	0,01500	0,011	±26
	3,282			0,00890		
	3,284			0,00960		
	3,272			0,01000		
Vinj (µL)	Temps retenció (min)	Mitjana Tr	RSD (%)	LD (mg/L)	Mitjana LD	RSD (%)
100	3,259	3,269	±0,2648	0,01030	0,010	±16
	3,280			0,01250		
	3,269			0,00990		
	3,267			0,00840		

Taula 60. Límits de detecció per al Cr(VI) a diferents volums d'injecció

En aquesta secció, la determinació del LD s'ha realitzat amb la finalitat d'obtenir informació per a l'elecció del volum d'injecció. Cal remarcar que posteriorment es va adquirir un nou cromatògraf que va proporcionar millors resultats en els LD (veure Taula 65 de l'apartat 8.9.3).

S'aprecia que els temps de retenció i els valors de LD van ser casi idèntics per als tres volums. S'opta per treballar amb 50 µL, tot i que en mostres problemàtiques es podrà incrementar aquest volum fins a 60 µL.

8.5.4. Consideracions pràctiques: seqüència d'anàlisi, rutina de treball, precaucions i manteniment

A continuació s'enumeren les principals consideracions pràctiques relatives a la seqüenciació de les rutines de treball en la determinació de Cr(VI). També s'indiquen algunes precaucions deduïdes a través de l'experiència adquirida en les anàlisis desenvolupades:

- Començar amb equilibrat inicial de 50 minuts amb la fase mòbil. S'ha comprovat que aquest temps és suficient per obtenir una línia de base plana, sense fluctuacions.
- Realitzar un equilibrat de 5 minuts amb fase mòbil entre injeccions consecutives d'analit.
- Finalitzar la seqüència de treball amb un rentat de 50 minuts amb aigua UP. (Per evitar traces de sals en el circuit, s'ampliarà el rentat a 120 minuts si posteriorment s'ha de treure la columna o s'ha de realitzar una nova aplicació).
- No posar en contacte solucions fortament salines (per exemple, sulfat amònic 25 mM) amb metanol ni amb acetonitril (podrien produir-se cristal·litzacions que perjudicarien el detector).
- En les rutines de treball cal injectar un patró de control de 0,02 mg/L en Cr (VI).
- Per confirmar la identitat del cromat, comparar els espectres UV/VIS de la solució d'assaig, de la solució patró de crom (VI), i de les mostres de diferents concentracions de cromat emmagatzemades en la llibreria digital.
- En les condicions definides a la Taula 61 de l'apartat 8.5.5, el temps de retenció de l'anió cromat ha d'estar entre 3-4 minuts. Quan aquest valor baixi de 3 minuts, la columna necessita una restauració (veure Annex 5). Les causes de la variabilitat en el temps de retenció es comenten en el punt 8.6.

8.5.5. Resum de les condicions cromatogràfiques

Les proves realitzades fins ara han permès definir les condicions cromatogràfiques i programar les seqüències d'anàlisi i d'injecció en una rutina de treball diari. Aquesta informació es resumeix a la Taula 61.

Condicions cromatogràfiques	
Equilibrat inicial	50 minuts
Temperatura	30 ± 1°C
Fase mòbil: sulfato amònic	25 mM en sulfato amònic (pH 8,0 ± 0,2)
Longitud d'ona de treball (detector fotodíodes)	372 nm (Recuperació de l'espectre en l'interval de 200 a 550 nm)
Flux	0,9 mL/minut
Volum d'injecció	50 µL (en mostres amb molt baix contingut en crom(VI) s'injectaran 60 µL)
Nombre d'injeccions per cada mostra	2
Durada de la injecció	5 minuts
Equilibrat entre injeccions	5 minuts
Rentat final de cada seqüència	50 minuts amb aigua UP
Rentat al final de l'aplicació de cromatografia iònica	120 minuts amb aigua UP

Taula 61. Condicions cromatogràfiques i dades per a la programació de seqüències d'anàlisi en la determinació de crom hexavalent en pell

8.6. Identificació del crom (VI) en el cromatograma

Les condicions cromatogràfiques definides en l'apartat 8.5.5 garanteixen la identificació i la confirmació fiable del crom (VI) com a anió cromat. Això s'aconsegueix per comparació de l'espectre UV/VIS del pic detectat amb l'espectre estàndard de cromat i per comparació dels temps de retenció del pic detectat amb el del patró de control que sempre s'injecta en qualsevol rutina de treball.

En definitiva, cal comparar els espectres UV/VIS de la solució d'assaig, de la solució patró de crom (VI), i de les mostres de diferents concentracions de cromat emmagatzemades en la llibreria digital.

Les imatges de la Fig. 65 i la Fig. 66 són exemples de cromatogrames de dos extractes de pell.

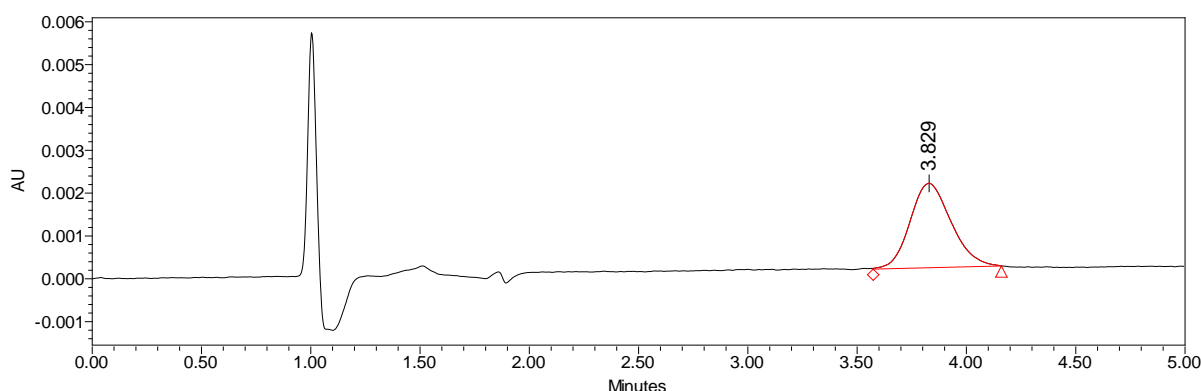


Fig. 65. Cromatograma obtingut d'una mostra de pell que conté 5 mg Cr (VI)/kg ,segons les condicions de Taula 61

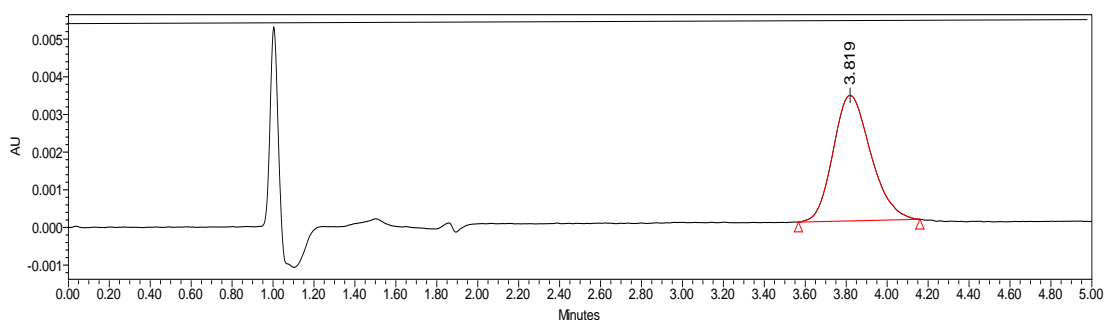


Fig. 66. Cromatograma obtingut d'una mostra de pell que conté 7,7 mg Cr (VI)/kg, segons les condicions de la Taula 61

En aquestes condicions, el temps de retenció de l'anió cromat està entre 3 i 4 minuts. És ben coneguda la pèrdua de reproductibilitat en el temps d'elució a causa de les resines d'intercanvi iònic. Aquest fet és degut a que normalment els processos d'elució no són capaços d'alliberar totalment tots els centres actius de la resina dels ions que té units. Per tant, periòdicament cal un tractament enèrgic que netegi tots els ions retinguts i retorni la fase estacionària al seu estat original. Aquest tractament és el denominat regenerat (98). Tal com s'ha esmentat a l'apartat 8.5.4, quan el temps de retenció del cromat baixi de 3 minuts, caldrà restaurar la columna segons el protocol de l'Annex 5.

8.7. Calibratge

8.7.1. Linealitat

Es van preparar, a partir d'una solució patró de 1,00 mg/L de crom (VI) (apartat 8.4), sis patrons de calibratge dins l'interval de 0,02 a 0,60 mg de Cr/L, d'acord amb la norma ISO 17075:2007.

mg Cr(VI)/L	Equivalència en mg Cr(VI)/Kg de pell
0,02	1,0
0,05	2,5
0,10	5,0
0,20	10
0,40	20
0,60	30

En tots els casos les injeccions es van fer per duplicat. A partir de les àrees dels pics s'ha construït la corba de calibratge (condicions cromatogràfiques de la Taula 61). El PNT corresponent a la determinació cromatogràfica de crom hexavalent en pells, que es troba a l'Annex 6 mostra les dades d'una recta de calibratge.

S'ha verificat la bondat de l'ajust lineal a través del coeficient de correlació (r) i del contrast F de l'anàlisi ANOVA. S'ha obtingut un valor de $r > 0,999$ i s'ha constatat que $F_{\text{exp}} > F_{\text{taules}}$. Es pot afirmar que no hi ha evidències de diferències significatives en el grau d'acoblament dels punts al model lineal.

Altres rectes de calibratge construïdes en diferents períodes de temps, també han coincidit en la bondat de l'ajust lineal tal com es mostra en l'apartat 8.7.2.

8.7.2. Estabilitat i robustesa del calibratge

Es va realitzar una anàlisi estadística per comparar els pendents de tres corbes de calibratge obtingudes de forma independent en dates separades per intervals de temps de 3-4 mesos aproximadament i amb un període de diferència total de 7 mesos. Es van aplicar test de significació (Tests F i t) (144) per confrontar, dos a dos, les tres rectes de calibratge construïdes.

Aquest estudi és una eina que permet valorar la reproductibilitat, l'estabilitat i la robustesa del calibratge en la determinació de Cr(VI).

La precisió intermèdia o reproductibilitat es refereix a la precisió obtinguda sota les mateixes condicions operatives (mateix mètode, analista i instrument de mesura), però diferents dies.

D'altra banda, la comparativa dels pendents també informa sobre la robustesa de la determinació cromatogràfica perquè permet mesurar el grau de concordança dels resultats obtinguts quan hi ha variabilitat de diferents factors tals com preparació de nous patrons i de fase mòbil, envelliment de la columna i del detector, o petites diferències en altres condicions experimentals.

La Taula 62 mostra el rang de valors de concentració emprats en els patrons. Aquests es van preparar a partir d'una solució patró de 1,00 mg/L de crom (VI) (apartat 8.4), d'acord amb la norma ISO 17075:2007.

Patrons de Cr(VI) pel calibratge		
Nº de patró	Concentració en mg Cr(VI)/L	Concentració en mg Cr(VI)/kg de pell
1	0,020	1,0
2	0,050	2,5
3	0,10	5,0
4	0,20	10
5	0,40	20

Taula 62. Patrons de Cr (VI) pel calibratge

La Taula 63 presenta les rectes de calibratge obtingudes (mateix laboratori, mateix equip, mateix analista i amb patrons preparats el mateix dia de l'anàlisi).

Rectes de calibratge obtingudes		
9 de juliol de 2014	25 de novembre de 2014	9 de febrer de 2015
$Y=269916x-755$	$Y=272824x-699$	$Y=270947x-909$
$r=1,0000$	$r=1,0000$	$r=1,0000$
$F_{exp} > F_{taules}$	$F_{exp} > F_{taules}$	$F_{exp} > F_{taules}$

Taula 63. Comparativa de diferents rectes de calibratge de Cr(VI)

En tots els casos, els tests de significació en la comparació de les anteriors rectes dos a dos han determinat que les diferències entre els pendents no són significatives en un nivell de significació del 95 (144).

S'ha demostrat l'estabilitat del calibratge en un període de set mesos i la robustesa del mateix.

Com ja s'ha exposat, la planificació d'aquest calibratge es va efectuar prenent com a referència la norma ISO 17075 del 2007, únic document oficial escaient que estava disponible en el moment d'iniciar aquesta recerca. Aquesta norma, com s'ha vist, estableix la preparació de sis patrons. Un cop verificada l'excel·lent linealitat del calibratge, es va acordar en el Grup de Treball 1 del Comitè Tècnic 289 de la ISO que en la futura norma ISO 17075-2 el calibratge es realitzés amb tan sols 5 patrons, de concentracions compreses entre els 0,050 i els 1,00 mg/L de crom (172).

8.8. Esquema del nou procediment cromatogràfic

Les proves preliminars han permès fixar les condicions cromatogràfiques i experimentals per a la determinació del crom hexavalent en cuir mitjançant cromatografia iònica i elaborar el corresponent PNT (Annex 6). La Fig. 67 presenta un esquema del procediment.

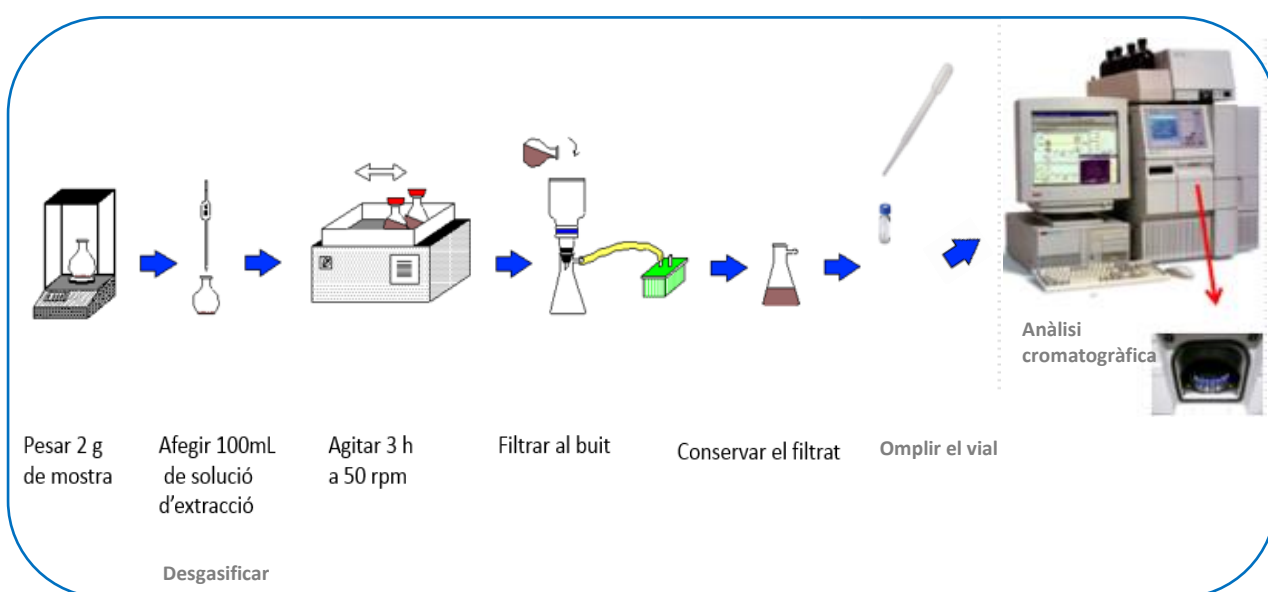


Fig. 67. Esquema del procediment cromatogràfic per a la determinació de crom hexavalent en pell

La mòlta del cuir es realitza de conformitat amb la norma ISO 4044:2008.

S'observa que les etapes de mostreig i extracció són idèntiques a les del mètode colorimètric (Fig. 55). Cal destacar que la simplicitat del nou mètode cromatogràfic permet l'anàlisi directa de l'extracte. No es requereix dilució ni decoloració amb SPE, fet que implica menor manipulació de la mostra. Les condicions cromatogràfiques són les recollides a la Taula 61.

8.9. Validació interna del mètode cromatogràfic

Al Capítol 4 s'han definit i exposat els conceptes relacionats amb la validació de mètodes analítics. S'ha vist que quan es desenvolupa un mètode amb elevades perspectives d'ús, com és el cas d'un procediment normalitzat publicat, la manera preferida de portar a terme la validació és mitjançant un estudi de col·laboració que involucri un grup de laboratoris.

La validació del nou mètode cromatogràfic proposat s'ha realitzat de manera interna en el laboratori i també a través d'assajos intercomparatius, ja que el mètode desenvolupat ha d'esdevenir norma oficial. Alguns dels paràmetres de validació interna s'han comprovat durant el procés de posada a punt del mètode, i d'altres s'han valorat comparant la concordança entre els resultats obtinguts pel nou mètode i la norma ISO 17075:2007 (estudi comparatiu dels dos mètodes).

Aquest apartat és centra en la validació interna. Els resultats de la validació a través d'assajos intercomparació entre laboratoris es troben en el punt 8.10.

8.9.1. Selectivitat

La selectivitat del procediment cromatogràfic ha estat comprovada al llarg del desenvolupament del mètode mitjançant la utilització del detector de fotodíodes. Aquest detector permet la confirmació fiable de la identitat de cromat mitjançant la comparació de l'espectre UV del pic detectat amb el pic estàndard de cromat. La selectivitat de la detecció està especialment reforçada per la recuperació del cromatograma a la longitud d'ona de 372 nm, tal com s'ha detallat als apartats 8.5.2 i 8.6. En definitiva, no s'espera la presència d'altres pics en les proximitats del pic de cromat detectat a 372 nm. De fet, en cada un dels cromatogrames de les més de les 50 mostres de cuir analitzades al llarg d'aquesta tesi no ha aparegut més d'un pic. Una altra bona observació de la selectivitat del mètode proposat és que tots els cromatogrames obtinguts després de la fortificació dels extractes amb una quantitat coneguda de cromat presenten només un pic, el pic del ió cromat. (L'estudi d'exactitud es presenta a l'apartat 8.9.5).

En definitiva, ha quedat demostrada la capacitat del nou mètode cromatogràfic per identificar i quantificar de forma inequívoca l'anió cromat en presència d'altres substàncies químiques que puguin estar presents en la mostra.

8.9.2. Linealitat i Rang

L'apartat 8.7, que fa referència al calibratge, ha demostrat la linealitat i la reproductibilitat de les corbes de calibratge en el rang de 0,02 fins a 0,60 mg de crom/L. L'avaluació de la linealitat s'ha dut a terme a través del coeficient de correlació r i del contrast F de l'anàlisi ANOVA.

8.9.3. Límit de detecció i límit de quantificació

D'acord amb la norma ISO 17075:2007, els resultats de Cr(VI) per sota de 3 mg/kg tenen una fiabilitat limitada degut a la complexitat de matriu de cuir. Tegtmeyer i Kleban (12) també consideren mantenir un límit de quantificació de 3 mg/kg. Les versions revisades al 2016 de les normes ISO 17075-1 i ISO 17075-2 mantenen aquest valor.

S'han calculat els límits de detecció i de quantificació amb els procediments definits a l'apartat 4.3.3. Aquests paràmetres s'han determinat amb dos cromatògrafs iguals però de diferent edat:

- un d'ells amb més de 10 anys d'antiguitat (en l'equip i en el detector) i amb una columna de 4 anys.
- l'altre equipament de nova adquisició (cromatògraf, detector i columna).

Les injeccions s'han realitzat per quintuplicat. La Taula 64 recull els resultats per a dos patrons de Cr (VI) amb el cromatògraf nou, mentre que la Taula 65 engloba els valors de LOD i LOQ obtinguts amb ambdós equips (antic i modern). Els resultats també s'han expressat en mg Cr(VI)/L. Per exemple, el LOD que proporciona el cromatògraf nou és 0,0021 mg Cr(VI)/L. Per expressar aquest valor en mg/kg suposem que el crom s'ha obtingut a partir de l'extracció de 2 g de pell amb 100 mL de solució extractiva (segons el procediment de la Taula 58):

$$0,0021 \text{ mg/L} * 100 \text{ mL} / 2 \text{ g} = \mathbf{0,10 \text{ mg/kg}} \quad (\text{Injecció } 50 \mu\text{L, cromatògraf modern})$$

Patró de 0,0507 mg Cr(VI)/L (enrasat amb solució extractiva)								
Vinj (µL)	Alçada (unitats d'absorbància)	Mitjana Alçada	Àrea	Mitjana Àrea	RSD (%)	LOD(mg/L)	Mitjana LOD(mg/L)	RSD (%)
50	0,00190	0,00129	13201	13313	±1,9	0,00146	0,0018	±20
50	0,00084		13678			0,00228		
50	0,00121		13258			0,00207		
50	0,00119		13116			0,00165		
50	0,00121		13281			0,00158		
Patró de 0,0203 mg Cr(VI)/L (enrasat amb solució extractiva)								
Vinj (µL)	Alçada (unitats d'absorbància)	Mitjana Alçada	Àrea	Mitjana Àrea	RSD (%)	LOD(mg/L)	Mitjana LOD(mg/L)	RSD (%)
50	0,00051	0,00050	5349	5216	±1,7	0,00213	0,0024	±11
50	0,00050		5190			0,00230		
50	0,00050		5184			0,00218		
50	0,00050		5142			0,00178		
50	0,00047		5064			0,00346		

Taula 64. Límits de detecció per al Cr(VI) obtinguts amb el cromatògraf nou i amb dos patrons diferents

	LOD		LOQ	
	mg Cr(VI)/L	mg Cr(VI)/kg	mg Cr(VI)/L	mg Cr(VI)/kg
Cromatògraf antic	0,012	0,60	0,040	2,0
Cromatògraf nou	0,0021	0,10	0,0066	0,33

Taula 65. Comparativa del LOD i LOQ de dos cromatògrafs de diferent edat i obtinguts per injecció de 50 µL de patrons de Cr(VI) de concentracions de l'ordre de 0,05 i 0,02 mg/L

Els valors teòrics de LOQ per al cromatògraf antic i el modern són 2,0 mg/kg i 0,33 mg/kg respectivament. No obstant, atès que no es pot assegurar que concentracions molt baixes del Cr(VI) determinades en un extracte de mostra de pell provinquin exclusivament de la mostra i no de l'oxidació d'una fracció del crom trivalent present en l'extracte, (oxidació facilitada pels valors de pH de la solució extractiva) (10,12), el límit de quantificació es manté en tots els casos igual a 3 mg/kg.

S'observa que el nou cromatògraf proporciona millors límits de detecció i de quantificació. La diferència entre els resultats dels dos equips cromatogràfics pot atribuir-se a la línia de base més plana (soroll més reduït) que proporciona un detector nou. Aquest fet implica que per a una mateixa sensibilitat (una mateixa relació àrea/alçada pic), el cromatògraf nou origina un LOD molt més baix. Una línia de base sorollosa afecta la sensibilitat front l'analit i augmenta els límits de detecció i de quantificació. S'ha comprovat que l'envelliment del detector contribueix a la pèrdua de sensibilitat.

En definitiva, en tots dos cromatògrafs es demostra que el LOD és suficientment baix per assegurar el límit de concentració de 3 mg/kg establert per al paràmetre de crom hexavalent en la Norma ISO 17075 i en el Reglament Reach.

8.9.4. Precisió: Comparativa entre els mètodes colorimètric i HPLC

La literatura indica que per avaluar l'acceptabilitat de les característiques de precisió d'un mètode analític es poden comparar els valors calculats de repetibilitat i reproductibilitat amb els corresponents valors obtinguts amb els mètodes vigents. Si els resultats són satisfactoris, podrà considerar-se validat el paràmetre de precisió. En cas de no disposar d'un mètode amb el qual comparar la precisió, els valors teòrics de repetibilitat i reproductibilitat poden calcular-se aplicant l'equació de Horwitz (137), tal com es va fer en la determinació d'anions en pell (apartat 6.7.4).

En aquesta ocasió, per tal d'estudiar la precisió, s'han comparat els resultats obtinguts pel mètode colorimètric (ISO 17075:2007) i amb els que proporciona el nou mètode cromatogràfic. Inicialment es van analitzar simultàniament, per ambdós procediments, 50 mostres de pells comercials adobades al crom per calçat, roba, marroquineria i articles de protecció. Les extraccions i les determinacions s'han fet per duplicat.

Només en una de les mostres s'ha trobat amb seguretat la presència de crom hexavalent i ambdós mètodes han coincidit en proporcionar un valor de 8 mg/kg de crom (VI). Altres dues mostres han donat problemes en l'anàlisi pel mètode colorimètric. Aquestes dificultats es descriuen en l'apartat 8.12.2. Els dos mètodes han

concordat en la no detecció de crom hexavalent en les 47 mostres restants. Tot i que és bo que ambdós mètodes hagin coincidit en l'avaluació qualitativa de les mostres analitzades, calien més pells amb presència de crom (VI) per avaluar la precisió i l'exactitud.

Per poder disposar d'un major nombre de mostres amb presència de Cr (VI) es van sotmetre a estrès tèrmic 14 cuirs escollits per la seva previsible tendència a l'oxidació. L'envelliment tèrmic va consistir en exposar les pells en estufa a 80°C durant sis hores. Després d'analitzar-les, s'ha trobat crom hexavalent en 12 d'elles. En un dels cuirs "crust" no es va detectar crom (VI), però va ser recobert amb un acabat de color taronja que contenia pigment de cromat de plom (pigment vermell 104). En aquest cuir acabat sí es va detectar crom. En total es va disposar de 14 mostres per poder comparar ambdós mètodes. Els resultats obtinguts en les 14 pells en què es va detectar la presència de Cr(VI) es presenten a la Taula 66.

Descripció de la mostra	Concentració de crom (VI), en mg/kg de Cr			
	Determinació cromatogràfica		Determinació colorimètrica	
	Mitjana aritmètica	± RSD, %	Mitjana aritmètica	± RSD, %
Cuir sense envellir				
Vacú per empenya, color blau	8,1	5,3	8,3	11,0
Box-calf per empenya, amb Pigment Red 104	7,1	1,2	7,2	6,5
Cuir envellit				
Serratge no tenyit per articles de protecció	19,9	2,3	22,3	6,7
Serratge no tenyit per articles de protecció	6,4	1,0	6,3	1,3
Serratge no tenyit per articles de protecció	22,6	1,0	22,3	0,7
Serratge no tenyit per articles de protecció	24,2	2,8	25,5	3,7
Cabra Crust no tenyida	8,1	0,7	7,0	9,6
Cabra Crust no tenyida	4,3	2,7	3,1	9,8
Cabra Crust no tenyida	16,1	0,5	15,4	5,6
Cabra Crust no tenyida	10,7	0,5	8,3	3,6
Xai Crust no tenyit	9,0	0,6	7,3	7,0
Xai Crust no tenyit	7,1	0,4	6,2	14,0
Xai Crust no tenyit	6,1	6,5	6,1	19,0
Serratge no tenyit per guants de seguretat	8,8	0,6	8,4	5,9
Dispersió mitjana (expressada com a ± RSD, %)	1,9		7,5	

Taula 66. Concentracions de Cr(VI) en les mostres de pell

Cap dels cromatogrames obtinguts de les anàlisis de les mostres de cuir va produir més d'un pic, fet que recolza la bona selectivitat de la determinació de crom hexavalent per HPLC.

El mètode cromatogràfic ha mostrat, en 13 de les 14 mostres comparades, resultats més precisos. La dispersió mitjana del mètode cromatogràfic, expressada com la desviació estàndard relativa, va ser només $\pm 1,9 \%$, mentre que la dispersió mitjana del mètode colorimètric va ser de $\pm 7,5 \%$.

Els resultats obtinguts per ambdós mètodes són del mateix ordre de magnitud en totes les mostres. En 9 de les 14 pells els valors obtinguts per HPLC són superiors als del mètode colorimètric.

8.9.5. Exactitud: Comparativa entre els mètodes colorimètric i HPLC

Degut a la impossibilitat de fabricar mostres de pell amb una concentració coneguda de crom hexavalent, s'ha avaluat l'exactitud mitjançant la determinació del % de recuperació en mostres addicionades. La recuperació d'una quantitat coneguda d'analit és una de les eines més importants d'avaluació de la qualitat d'un mètode. També és útil per detectar errors sistemàtics, deguts a la matriu de la mostra, que poden disminuir la fiabilitat dels resultats. D'acord amb la norma ISO 17075:2007, la taxa de recuperació haurà d'estar entre el 80 % i 120 %.

L'estudi de la taxa de recuperació es va realitzar en 10 mostres, per duplicat, i simultàniament amb ambdós mètodes. Les proves es van dur a terme per addició a una alíquota de 10 mL de l'extracte de cuir, d'un volum adequat d'una dissolució estàndard amb la finalitat de duplicar aproximadament la concentració de crom (VI) en l'extracte de forma que el volum final de la solució s'incrementés com a màxim un 10%. La concentració i el volum del patró emprat es van seleccionar de manera que el volum final de la solució dopada fos 11 mL com a màxim, i en tots els casos es van aplicar les dades de la Taula 67.

.

Dissolució estàndard per a la determinació de la recuperació sobre 10 mL d'extracte filtrat		
Resultat obtingut de Cr VI (mg/Kg)	Concentració del patró de Cr(VI) (mg/L)	Volum de patró (mL) a afegir sobre els 10.0 mL de l'extracte
< 2	—	—
2,1 - 4	1,00	0,60
4,1 - 6	1,00	1,00
6,1 - 10	5,00	0,40
10,1 - 20	5,00	0,70
> 20,1	5,00	1,00

Taula 67. volum de patró de Cr(VI) a emprar en el % de recuperació en funció del contingut de crom de la mostra

L'índex de recuperació es va calcular d'acord a la següent expressió:

$$N = \frac{\text{mg Cr totals (extracte + afegits)} - \text{mg Cr extracte}}{\text{mg Cr afegits}}$$

Totes les anàlisis, per ambdós mètodes, compleixen la recomanació de 80 – 120 % per al límit de recuperació, com mostren els resultats de la Taula 68. La determinació cromatogràfica ha proporcionat uns índexs de recuperació de 84 a 108 %.

Comparativa de l'índex de recuperació en la determinació de Cr(VI)				
Descripció de la mostra	Determinació cromatogràfica		Determinació colorimètrica	
	Cr (VI) mg/kg	%Recuperació	Cr (VI) mg/kg	% Recuperació
Napa xai per confecció	<3	98	< 3	98
Boví per empenya, color blau	8,1	97	8,3	85
Boví per empenya, amb Pigment Vermell104	7,1	108	7,2	102
Serratge no tenyit per guants de seguretat	22,6	100	22,3	103
Serratge no tenyit per guants de seguretat	24,2	102	25,5	99
Cabra crust sense tenyir	8,1	95	7,0	119
Xai crust sense tenyir	9,0	99	7,3	114
Xai crust sense tenyir	7,1	84	6,2	114
Xai crust sense tenyir	6,1	84	6,1	96
Serratge no tenyit per guants de seguretat	8,8	108	8,4	93

Taula 68. Resultats obtinguts en l'estudi de recuperació

Convé remarcar que tots els cromatogrames dels extractes fortificats amb una quantitat coneguda de cromat presenten només un pic (l'anió cromat). Aquest fet és una bona observació de la selectivitat del mètode proposat.

8.10. Assajos col·laboratius interlaboratoris (validació externa)

Com s'ha explicat a l'apartat 4.2, la participació en assajos d'aptitud constitueix un mecanisme d'avaluació de la qualitat dels resultats analítics i representa una font d'informació útil en la validació de mètodes. Un dels criteris per a la selecció d'un mètode analític és donar preferència a mètodes que hagin establert la seva qualitat i confiança mitjançant estudis col·laboratius interlaboratoris .

El mètode cromatogràfic proposat per a la determinació de Cr(VI) en pells ha estat avaluat mitjançant la participació en dos assajos interlaboratoris coordinats pel CSIC.

Cal destacar la dificultat d'aconseguir un material de cuir homogeni per construir amb ell les mostres de referència dels estudis interlaboratoris de determinació de crom hexavalent en cuir. Proves realitzades en el laboratori de l'Escola d'Enginyeria d'Igualada, no publicades, van proporcionar valors de dispersió de $\pm 34\%$ en l'anàlisi del contingut en crom en cinc parts diferents d'un crupó de serratge engreixat amb olis molt insaturats sense tractament antioxidant, després de sotmetre la pell a un procés d'envelliment tèrmic. Assaigs interlaboratoris internacionals s'han hagut de suspendre per no poder subministrar el coordinador un material homogeni als participants (173).

Els resultats dels dos assajos col·laboratius han estat comparats amb les dades d'incertesa, repetibilitat i reproductibilitat que ofereix l'Annex de la norma EN ISO 17075:2007, corresponents també a dos assajos interlaboratoris amb el mètode fotolorimètric. Aquestes són les úniques dades prèvies de què es disposa per poder fer la comparativa.

Segons ENAC (Entitat Nacional d'Accreditació), poden utilitzar-se els resultats d'estudis previs per avaluar la incertesa d'un mètode, sempre que es demostrï que es pot aconseguir una precisió similar a l'aconseguida prèviament (174)..

La incertesa és un valor estimat que acompanya un resultat analític, i que expressa l'interval de valors on se situa el valor veritable (UNE-ISO-3534-1:2013). Aquest paràmetre informa del grau de confiança dels resultats perquè reflexa quant pot

allunyar-se un resultat analític del valor considerat veritable (175). (La repetibilitat i la reproductibilitat ja es van definir en l'apartat 4.3.4).

En aquesta avaluació, com a criteri d'acceptació s'ha considerat que la qualitat dels resultats del nou mètode cromatogràfic hauria de ser millorada o almenys mantinguda en relació amb les dades dels interlaboratoris que recull la ISO 17075:2007

Els assajos interlaboratoris duts a terme conclouen que **el mètode cromatogràfic aporta millors valors d'incertesa i de precisió** que el fotocolorimètric. La Taula 69 mostra la comparativa i l'Annex 7 informa sobre els assajos col·laboratius en què s'ha participat i detalla els resultats.

8.11. Conclusions generals de la validació del mètode cromatogràfic

Els resultats de la validació interna i dels assajos col·laboratius es recullen a la Taula 69. S'observa el compliment dels criteris d'acceptació definits, i per tant, es pot concloure que el nou mètode supera el procés de validació i és apte per a la determinació de crom hexavalent en mostres de pells.

Validació interna			
Paràmetre	Resultat	Criteris d'acceptació	Conclusió
Selectivitat	No hi ha interferències: -En tots els cromatogrames de les més de 50 mostres analitzades i dels assajos de recuperació apareix com a màxim un pic. -En totes les mostres positives hi ha concordança espectral entre l'espectre UV del pic detectat i el del pic estàndard de cromat.	No interferències	Compleix
Linealitat	En totes les rectes de calibratge $R > 0,999$ i $F_{exp} > F_{taules}$	$r > 0,99$ $F_{exp} > F_{taules}$	Compleix
LOQ	$< 3 \text{ mg Cr(VI)}/\text{kg}$	$< 3 \text{ mg Cr(VI)}/\text{kg}$	Compleix
Precisió	%RSD mitjana de 14 mostres analitzades: $\pm 1,9\%$ en mètode cromatogràfic $\pm 7,5\%$ en mètode ISO 17075 (13 de les 14 mostres proporcionen millor %RSD amb el mètode HPLC)	Precisió del mètode cromatogràfic superior al mètode oficial ISO 17075	Compleix
Exactitud	% Recuperació 84-108%	%Recuperació 80-120%	Compleix
Assajos col·laboratius (validació externa)			
Paràmetre	Resultat	Criteris d'acceptació	Conclusió
Incertesa	-Mètode fotolorimètric: $\pm 1,27 \text{ mg/kg}$ -Mètode cromatogràfic: $\pm 1,18 \text{ mg/kg}$	Incertesa del mètode cromatogràfic similar o millor a l'obtinguda pel mètode fotolorimètric	Compleix
Repetibilitat	-Relació Repetibilitat/Contingut mitjà Cr(VI) proporcionats per la Norma ISO 17075 (2007) (mitjana aritmètica de dos mostres): $0,18 \text{ mg/Kg}$ -Relació Repetibilitat/Contingut mitjà Cr(VI) segons mètode cromatogràfic (mitjana aritmètica de dos mostres): $0,085 \text{ mg/Kg}$	Valor de la relació entre Repetibilitat i Contingut mitjà Cr(VI) per HPLC similar o superior al proporcionat per la Norma ISO 17075 (2007)	Compleix
Reproductibilitat	-Relació Reproductibilitat/Contingut mitjà Cr(VI) proporcionats per la Norma ISO 17075 (2007) (mitjana aritmètica de dos mostres): $0,45 \text{ mg/Kg}$ -Relació Reproductibilitat/Contingut mitjà Cr(VI) segons mètode cromatogràfic (mitjana aritmètica de dos mostres): $0,35 \text{ mg/Kg}$	Valor de la relació entre Reproductibilitat i Contingut mitjà Cr(VI) per HPLC similar o superior al proporcionat per la Norma ISO 17075 (2007)	Compleix

Taula 69. Resultats de la validació interna i dels assajos interlaboratoris

8.12. Comparativa entre el mètode colorimètric i el nou mètode cromatogràfic

Les anàlisis pel mètode colorimètric oficial i pel nou mètode cromatogràfic de les més de 50 mostres de pells comercials adobades al crom han permès provar les prestacions de la nova metodologia i confrontar ambdós procediments.

La comparació de la precisió i l'exactitud s'ha presentat en els apartats 8.9.4, 8.9.5 i 8.11. Els següents subapartats comparen la càrrega de treball, el material de vidre necessari, i el consum de reactius i fungibles requerits per ambdós mètodes. També es detallen els casos conflictius resolts.

8.12.1 Càrrega de treball i consumibles

En l'anàlisi del crom hexavalent es poden diferenciar tres etapes:

1. Mostreig i preparació de la mostra.
2. Preparació de la solució analítica (extracció del crom hexavalent).
3. Determinació de Cr (VI): colorimètrica o cromatogràfica.

Les dues primeres etapes són idèntiques en els dos mètodes comparats. La diferència rau en la tercera, tal com es mostra a la taula comparativa de tasques de l'analista (Taula 70).

Comparativa càrrega de treball (per a dos rèpliques (dos extractes d'una mateixa mostra))		
Etapes de l' anàlisi	Colorimètric	HPLC
1. Preparació de la mostra	✓	✓
2. Extracció	✓	✓
3. Determinació Cr VI		
3.1. Filtració de l'extracte. Mesura pH	✓	✓
3.2. Activació cartutx SPS	✓	no
3.3. Enràs matràs 25 mL mostra	✓	no
3.4. Enràs matràs 20 mL	✓	no
3.5. Enràs matràs 25 mL blanc	✓	no
3.6. Temps reacció 15 min	✓	no
3.7. Injecció o lectura absorbància	✓	✓
3.8. Neteja material acumulat	✓	✓
Durada total 3ª etapa*	45 ± 3 min	6 ± 1 min

Taula 70. Comparativa etapes dels mètodes de determinació de crom (VI), ✓=es realitza, no=no es realitza.

*Aquests temps es refereixen a una anàlisi per duplicat i no contempla els apartats 1 i 2, ni el temps invertit en preparar els reactius.

S'observa que el mètode cromatogràfic disminueix les tasques de manipulació de l'extracte durant la determinació de crom (VI) i també escurça el temps requerit.







La Taula 71 contrasta el cost en reactius i material fungible de l'etapa de determinació de crom hexavalent de cada mètode. En aquest sentit, la determinació cromatogràfica resulta més econòmica.

Consumibles	Preu en € per determinació (etapa 3 per duplicat, dos extractes d'una mostra)	
	Colorimètric	HPLC
Hidrogenfosfat de potassi	0,53	0,26
DFC en acetona	0,05	x
Àcid fosfòric	0,05	x
ACN (Per activació cartutxos en el mètode colorimètric) (Per preparar l'aigua de rentat en el mètode HPLC)	0,53	0,10
Sulfat amònic	x	0,0040
Cartutxos SPS	10	x
Vials	x	1,2
Filtre per filtració fase mòbil	x	0,07
Filtre per filtració extracte pell	2,2	2,2
Cubetes d'un sol ús (4)	0,36	x
Columna cromatogràfica (2 injeccions)	x	3,30
TOTAL	13,7	7,1

Taula 71. Comparativa dels reactius i materials fungibles emprats en la determinació de Cr(VI) pel mètode fotolorimètric i pel cromatogràfic

S'ha contemplat la columna cromatogràfica com a material fungible. El cost relatiu de la columna que apareix a la Taula 71 s'ha obtingut per ponderació entre el nombre d'injeccions. Posant en pràctica les recomanacions de l'apartat 8.5.4 relatives a la columna, es pot incrementar apreciablement la vida d'aquesta. La durada d'una columna ve determinada per un gran nombre de factors interrelacionats (eluent, pH, neteja...); la literatura estima acceptable un rang entre 500 - 2000 injeccions abans de substituir-la (101). La columna emprada en la tesi ha permès realitzar 1050 injeccions abans de canviar-la.

També s'ha considerat el material volumètric necessari. Tal com detalla la Taula 72, el procediment HPLC destaca per requerir menys material, fet que repercuteix directament en una menor inversió en temps de neteja.

Etapa 3: Determinació de Cr(VI)				
Material volumètric emprat en el mètode fotolorimètric (per a una rèplica)				
1 pipeta o micropipeta de 10 mL 	1 micropipeta de 0,5 mL 	3 puntes de micropipeta 	3 matrassos aforats de 25 mL 	1 xeringa 
Material volumètric emprat en el mètode cromatogràfic (per a una rèplica)				
1 pipeta pasteur de plàstic 				

Taula 72. Comparativa del material volumètric emprat en l'etapa 3 per a una determinació de Cr (VI) en cada un dels mètodes

La Fig. 68, referida a la realització per duplicat de l'etapa 3, la determinació del crom hexavalent en dos extractes de la mateixa mostra, permet visualitzar gràficament l'estalvi en consumibles, en temps i en nombre d'instruments volumètrics emprats que presenta el mètode cromatogràfic.

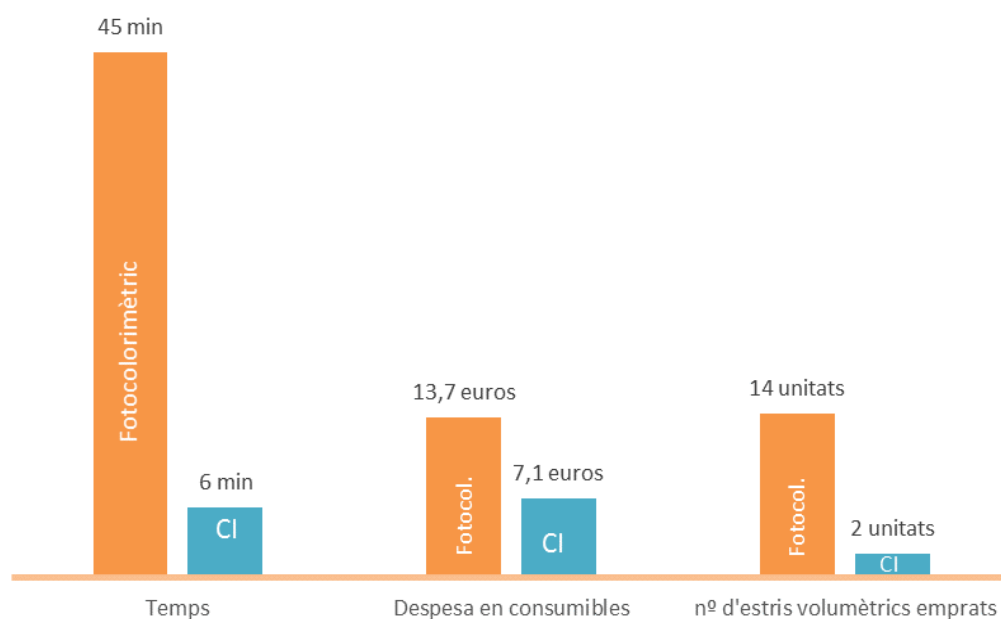


Fig. 68. Comparativa de temps, consumibles i material volumètric requerits pels mètodes colorimètric i cromatogràfic (etapa 3 per duplicat, dos extractes de la mateixa mostra)

D'altra banda, cal remarcar que el mètode HPLC redueix el volum de residus líquids generats al laboratori, perquè no necessita dilucions intermèdies.

La comparativa des de la perspectiva de càrrega de treball i consum de reactius i fungibles, ha demostrat que el mètode cromatogràfic és més avantatjós i ha permès extreure les següents **conclusions**:

- La determinació de Cr(VI) en una mostra de cuir pel **mètode HPLC** suposa un **estalvi de 7 € en consumibles**, una **disminució de 45 minuts en mà d'obra** de l'analista, un **menor ús de material volumètric** i la **reducció dels residus líquids** generats al laboratori.
- El mètode cromatogràfic ofereix **més seguretat** en les tasques de la determinació del crom hexavalent perquè disminueix les etapes de manipulació de l'extracte.
- La **simplicitat** d'aquest nou mètode el fa molt apropiat per a laboratoris que han de gestionar l'elevada càrrega de treball que suposa la determinació de crom (VI) en un nombre important de mostres.

8.12.2. Casos conflictius resolts

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi, la cromatografia ha permès resoldre dos casos conflictius en relació a la determinació de crom hexavalent.

En l'anàlisi de 50 mostres de diferents tipus de pells comercialitzades en el mercat espanyol per posar a prova les prestacions del nou mètode es van trobar dues mostres de comportament molt problemàtic en analitzar-les per la Norma ISO 17075:2007. Aquestes mostres van produir un extracte fortament acolorit que no és decolorava eficaçment (ni amb tres cartutxos d'extracció en fase sòlida connectats en sèrie). Es van provar fins i tot tres marques de cartutxos i cap d'elles va ser eficaç.

En el primer cas conflictiu, pell tenyida de color marró molt fosc (Fig. 69), l'anàlisi colorimètrica ISO 17075:2007 va produir resultats molt dispersos (4,5 mg/kg, 12,0 mg/kg i 9,0 mg/kg) que haurien d'haver advertit al laboratori que l'anàlisi d'aquesta mostra no era concloent. Però probablement no tots els laboratoris haurien arribat a aquesta conclusió, i en alguna localització podrien haver lliurat com a resultat una mitjana aritmètica. Per contra, en l'anàlisi de la mateixa pell per cromatografia iònica no es va detectar crom (VI).

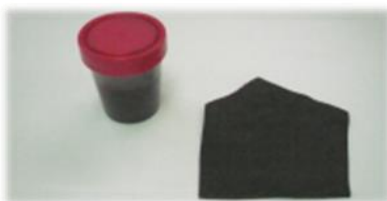


Fig. 69. Pell marró fosc, l'extracte de la qual no es va poder decolorar

La segona mostra problemàtica, tenyida en color vermell intens (Fig. 70), també va presentar dispersió de resultats en les rèpliques analitzades per colorimetria, sent el valor mitjà 3,3 mg Cr (VI)/kg. No obstant això, mitjançant HPLC es va determinar de manera reproducible que el crom hexavalent no era detectable en aquesta mostra (inferior a 3 mg /kg).

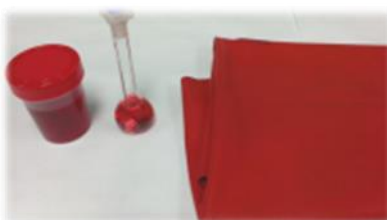


Fig. 70. Pell de color vermell, l'extracte de la qual no es va poder decolorar

Aquests dos exemples serveixen com a il·lustració de la seguretat que aporta el nou mètode. La cromatografia iònica ha evitat dos falsos positius produïts per la deficient decoloració dels extractes de les mostres i la interacció entre els colorants no eliminats i la difenilcarbazida.

Dos falsos positius entre un total d'unes 50 mostres analitzades no és un indicador extrapolable, a causa que en un laboratori d'investigació el percentatge d'incidències i mostres problemàtiques és superior a la situació del mercat, però sí que són un exemple molt clar d'alguna de les grans avantatges que aportarà el nou mètode.

8.13. Conclusions generals

S'han assolit tots els objectius plantejats inicialment:

- S'ha desenvolupat un mètode basat en la cromatografia iònica per determinar el contingut de crom hexavalent en mostres de cuir.
- S'han redactat els documents relacionats amb la nova metodologia analítica (protocols de manteniment i rutines de treball del sistema cromatogràfic, i PNT de la determinació de crom hexavalent per HPLC, Annexos 5 i 6 respectivament)
- S'ha contribuït a la validació del mètode a través d'un estudi intralaboratori i de la participació en dos exercicis col·laboratius interlaboratoris. També s'han contrastat el nou mètode i la norma colorimètrica ISO 17075:2007 a través de l'anàlisi de més de 50 mostres de cuirs comercials.
- S'ha dut a terme una comparació entre ambdós mètodes en relació a la càrrega de treball, el material volumètric i el consum de fungibles i reactius.

Referent al mètode proposat, es pot concloure que:

- Les condicions cromatogràfiques seleccionades permeten la identificació i la confirmació del crom (VI) com a anió cromat a un temps de retenció de 3-4 minuts.

- El mètode és selectiu. El detector de fotodíodes possibilita la confirmació fiable de la identitat de cromat mitjançant la comparació de l'espectre UV del pic detectat amb el pic estàndard de cromat. No s'ha detectat cap interferència.
- El nou mètode simplifica les etapes de manipulació de l'extracte perquè no requereix ni dilucions ni extracció en fase sòlida.
- El límit de detecció de la nova metodologia és suficientment baix per assegurar el límit de quantificació de 3 mg/Kg de crom hexavalent establert en la Norma ISO 17075 i en el Reglament Reach per a aquest paràmetre.
- L'aplicació dels test de significació (Tests F i t) als pendents de les rectes de calibratge construïdes en períodes de temps diferents ha permès comprovar l'estabilitat i la robustesa del calibratge.
- Els resultats dels assajos de recuperació que valoren l'exactitud de la determinació per HPLC es troben dins el rang d'acceptabilitat 80 - 120 %.
- L'anàlisi comparativa de més de 50 mostres de pells pels dos mètodes mostra resultats propers entre ells, però els resultats per HPLC van ser més precisos que els obtinguts pel mètode espectrofotomètric. Aquesta millora de precisió pot atribuir-se a la simplicitat del mètode cromatogràfic, que disminueix els processos intermedis.
- La validació interlaboratori compleix els criteris d'acceptabilitat establerts per a tots els paràmetres estudiats.
- El exercicis col·laboratius interlaboratoris en els què s'ha participat determinen que els valors d'incertesa i de precisió són millors en el mètode cromatogràfic.
- L'anàlisi cromatogràfica no està afectada per les interferències potencials del mètode espectrofotomètric clàssic de la difenilcarbazida, fet que aporta seguretat al mètode disminuint el risc de falsos positius produïts per la deficient decoloració dels extractes de les mostres i la interacció entre els colorants no eliminats i la difenilcarbazida. Per tant, el mètode cromatogràfic està especialment indicat en aquells cuirs amb baixes quantitats de crom (VI) i

per a aquelles pells que continguin substàncies interferents que puguin donar lloc a resultats falsos positius o inexactes pel mètode espectrofotomètric.

- El nou mètode, en comparació amb la norma ISO 17075:2007, disminueix la càrrega de treball, escurça el temps de l'anàlisi i redueix la quantitat de residus de laboratori. Aquests avantatges venen donats per la disminució de les etapes de manipulació de l'extracte i la major automatització del procediment cromatogràfic.
- El procediment cromatogràfic és més econòmic que el colorimètric.

En resum, el nou mètode cromatogràfic ha demostrat ser simple, fiable, robust, altament específic, sensible, reproducible, ràpid i més econòmic que el mètode colorimètric. Tanmateix, compleix amb el límit de quantificació establert per la comissió europea.

Poc abans de dipositar-se aquesta tesi ha estat publicada la nova norma ISO 17075-2:2017, basada en el mètode cromatogràfic desenvolupat. També s'ha publicat una nova versió del mètode colorimètric, la norma ISO 17075-1, de forma que coexisteixen dos normes internacionals ISO diferents, una cromatogràfica i una espectrofotomètrica. Convé destacar que l'organització ISO indica el següent: "Si una mostra de cuir s'analitza per les dues normes, els resultats obtinguts amb el mètode cromatogràfic es consideren com a referència. L'avantatge del mètode HPLC és que no hi ha interferències degut al color de l'extracte".

Aquest criteri s'aplicarà en els casos de falsos positius, com els presentats en la secció 8.12.2, per resoldre el conflicte entre els resultats diferents proporcionats per les dues normes, en aquelles mostres particulars.

Els bons resultats obtinguts plantegen futures aplicacions del procediment cromatogràfic en la determinació de crom hexavalent en colorants de complex metàl·lic i en altres matèries primeres consumides en el sector.

Capítol 9. Conclusions finals, recomanacions i difusió dels resultats

9.1. Conclusions finals i recomanacions

La recerca realitzada introdueix innovacions en l'àmbit analític del sector de la pell. S'han desenvolupat mètodes cromatogràfics amb detecció UV directa i indirecta per determinar els anions que contribueixen a la salinitat. La tècnica HPLC amb una fase estacionària d'intercanvi iònic i detecció ultraviolada proporciona un mètode fiable per a la quantificació simultània en l'ultraviolat d'anions absorbents i no absorbents presents en diferents mostres del sector adober.

La disponibilitat de la metodologia cromatogràfica proposada suposarà un progrés en les possibilitats d'un laboratori del sector de la pell perquè es podrà determinar el contingut aniònic en diferents mostres per cromatografia iònica amb detecció UV, en un únic anàlisi, i sense la necessitat de fer una inversió en un detector conductimètric. El cromatògraf de líquids, amb el detector UV, està disponible en els laboratoris del sector adober; forma part de l'equipament bàsic perquè existeixen metodiques oficials vigents amb aquesta tècnica. Per tant, es donarà més rendiment a la tècnica cromatogràfica només canviant la columna. Es podrà obtenir el màxim rendiment dels recursos d'un laboratori d'aquest sector.

D'altra banda, el procediment desenvolupat, validat i aprovat per l'organització ISO per a la determinació de crom hexavalent en pells i en bens de consum de cuir presenta importants avantatges respecte al procediment fotocolorimètric tradicional.

Es resumeixen les conclusions i recomanacions de les línies de recerca dels dos blocs experimentals treballats:

1. Desenvolupament i aplicació de metodologia cromatogràfica per a la determinació dels anions que contribueixen a la salinitat en la indústria de la pell.
2. Desenvolupament i validació d'un mètode cromatogràfic per quantificar el crom hexavalent en pells (en forma d'anió cromat).

Bloc 1. Desenvolupament i aplicació de metodologia cromatogràfica per a la determinació dels anions que contribueixen a la salinitat en la indústria de la pell

Metodologia per a la determinació d'anions d'interès en el sector adober amb Cl i detecció indirecta

- S'ha desenvolupat metodologia cromatogràfica, amb detecció UV indirecta i biftalat potàssic com a eluent, que permet analitzar simultàniament set anions inorgànics absorbents i no absorbents en l'UV amb un temps d'anàlisi raonable i amb una resolució superior a 1,5 entre tots els pics.
- L'estudi de la influència dels principals paràmetres que afecten el resultat cromatogràfic ha permès concloure que el pH és el factor determinant per aconseguir separar amb eficàcia els anions i disminuir el temps de retenció. Valors de pH compresos entre 6,2 i 6,5 han separat simultàniament els set anions estudiats.
- La concentració de l'espècie absorbent afecta la detecció i el temps de retenció. Una disminució de la concentració de biftalat disminueix l'absorbància de l'eluent i permet l'ús d'una longitud d'ona menor sense saturació del detector; també millora la sensibilitat, però augmenta el temps de retenció.
- Els eluents proposats per separar els analits inorgànics, en funció de la necessitat de prioritzar menor temps d'anàlisi o màxima sensibilitat, són:
 - a) 2 mM en biftalat potàssic a valors d'acetonitril compresos entre 6-10% i pH final 6,5 (menor temps de retenció).
 - b) 1 mM en biftalat potàssic a valors d'acetonitril de l'ordre 6-10% i pH final 6,2 (major sensibilitat).
- S'han establert les condicions cromatogràfiques que permeten analitzar simultàniament els 7 anions inorgànics absorbents i no absorbents.
- S'ha demostrat la linealitat de les rectes de calibratge per als anions estudiats en l'interval de concentracions de 5,00 fins a 100 mg/L. En tots els casos els coeficients de correlació han estat superiors a 0,9997

Metodologia per a la determinació d'anions absorbents i no absorbents en l'UV amb Cl i detecció directa

- S'ha desenvolupat un nou mètode, amb sulfat sòdic com a eluent, que permet detectar i quantificar els quatre analits absorbents estudiats (nitrat, nitrit, formiat i acetat) amb una resolució superior a 1,5. També detecta el bromur.
- De la comparativa entre la nova fase proposada, sulfat sòdic, i una de les fases típiques trobada a la literatura per anions absorbents en l'UV, borat-gluconat, s'extreu:
 - La fase mòbil borat-gluconat permet quantificar nitrat i nitrit, però no detecta els anions orgànics formiat i acetat.
 - L'eluent sulfat sòdic és adequat per determinar simultàniament nitrat, nitrit, formiat i acetat.
 - S'obtenen bones linealitats en les rectes de calibratge obtingudes amb ambdós eluents assajats.
 - La fase mòbil de sulfat sòdic proporciona la mateixa sensibilitat de calibratge, en el cas de nitrats i nitrats, que la fase mòbil borat-gluconat.
 - El mètode amb l'eluent sulfat sòdic és robust i el temps d'anàlisi és adequat.
 - El sulfat sòdic es presenta com a eluent més econòmic i de més fàcil preparació.
 - L'eluent borat-gluconat resol el nitrat i el nitrit a temps de retenció inferiors (temps total de 7 minuts front els 14 minuts en el cas l'eluent sulfat sòdic).
- En resum, es recomana la utilització de l'eluent sulfat sòdic per a la detecció directa dels anions nitrat, nitrit, bromur, formiat i acetat. L'eluent borat gluconat sols s'aconsella per estudis en què s'hagi de determinar únicament nitrat i nitrit en un nombre molt elevat de mostres i per tant, l'estalvi en temps de retenció justifiqui el major cost dels reactius i el superior temps de preparació.

La determinació d'anions com lactat, succinat, tartrat, oxalat, i altres, que poden ser indicadors químics rellevants en indústries alimentàries (vi, llet, cereals, cervesa...) queden fora de l'abast de la tesi i serien objecte d'un altre estudi.

Aplicació de la metodologia cromatogràfica a mostres de pells

S'han aplicat les metodologies cromatogràfiques desenvolupades, amb detecció indirecta i directa, a la determinació d'anions en mostres de pell:

- L'estudi de la millora del procés d'extracció d'anions en el cuir, centrat en dos factors importants (la velocitat i el nombre d'extraccions), confirma que la velocitat descrita a la norma UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6) i la realització d'una única extracció, són insuficients per extreure la totalitat dels anions. S'han proposat modificacions que milloren la quantitat d'anions extrets:
 - *Treballar a una velocitat superior a la indicada en la IUC6.* Concretament extreure els anions a 170 ± 10 rpm (regim turbulent) perquè s'obtenen resultats que són sempre millors o iguals als obtinguts amb la velocitat indicada per la norma IUC6.
 - *Realitzar extraccions múltiples.* S'ha comprovat que l'extracció simple proporciona resultats inferiors al contingut aniònic real en comparació als resultats obtinguts amb múltiples extraccions. S'ha observat que en les pell acabades el rendiment d'una única extracció és inferior a l'obtingut en les pells no acabades. Probablement caldria realitzar un desengreixat per determinar més eficaçment els anions en les pells acabades. No obstant això, aquesta conclusió hauria de confirmar-se amb un ventall més ampli de pells.
- S'ha demostrat la viabilitat de la metodologia cromatogràfica per a la determinació dels anions clorur, formiat, fosfat, sulfat i nitrat en pells:
 - Es recomana la cromatografia amb detecció directa per a la determinació del formiat.

- En algunes pells, les que contenen fosfats, la determinació de l'anió format és més complexa perquè el temps de retenció és el mateix per als dos anions quan s'utilitza la detecció indirecta. Però s'ha dissenyat un protocol que permet la quantificació del format en presència de fosfats. Tanmateix, en mostres complexes que contenen format i fosfat i no es pot confirmar la identitat del format amb detecció directa, es recomana determinar el fosfat, en l'extracte, per una mesura de ICP-OES.
- S'ha observat que les concentracions aniòniques varien segons la pell. Les mostres analitzades contenen format en concentracions màximes de 8900 mg/kg pell. En cas de l'anió clorur la concentració màxima és de l'ordre és de 38200 mg/L. Per l'anió sulfat s'obtenen unes concentracions de l'ordre de 304 a 9980 mg/kg pell. En les mostres de pells acabades s'ha trobat nitrat en concentracions de l'ordre de 40 a 800 mg/kg pell.
- S'han obtingut dades òptimes en l'estudi dels paràmetres de validació del mètode (selectivitat, linealitat, límit de detecció, precisió i exactitud).

Aquesta recerca és una primera aportació en la determinació d'anions en pell mitjançant cromatografia iònica, i suposa el pas inicial per a la millora de la norma UNE-EN ISO 4098:2006 (IUC6) sobre l'extracció de matèries solubles aplicada a mostres de cuirs.

Posteriorment, els nous procediments cromatogràfics han permès a la *Cátedra A3 In Leather Innovation* un estudi a gran escala, per a una firma de gran luxe, amb l'objectiu d'investigar la tendència de corrosió en les pells. Els clorurs i els sulfats s'han determinat per la metodologia amb detecció indirecta proposada en la tesi.

Es recomana, com a propostes de continuïtat en posteriors treballs:

- Aprofundir en l'estudi de l'eficàcia del procés d'extracció. Un dels efectes a valorar és el desengreixat de les pells acabades.
- Estendre la recerca a mostres complexes que contenen formiat i fosfat però que no permeten la confirmació del formiat amb detecció directa.
- Ampliar la validació a més mostres de pell.

Altres aplicacions pràctiques dels mètodes cromatogràfics desenvolupats (productes químics del sector adober, mostres mediambientals i d'altres sectors)

Els mètodes cromatogràfics desenvolupats s'han aplicat amb èxit a diverses mostres del sector adober i d'altres sectors:

- Amb detecció indirecta i fase mòbil biftalat potàssic s'han quantificat simultàniament anions no absorbents en l'ultraviolat.
 - Clorurs i sulfats en colorants, dispersants naftalensulfònics, extractes tànnics de mimosa, olis i àcids fòrmics comercials.
 - Sulfats i fosfats en banys galvànics.
 - Nitrats, clorurs i sulfats en mostres d'aigües residuals (participació en assajos d'intercomparació)
- Amb detecció directa i sulfat sòdic com a eluent, s'han quantificat anions absorbents en l'UV:
 - Quantificació d'àcids fòrmics comercials.
 - Determinació de nitrats en aigües d'interès ambiental.
 - Anàlisi de nitrats en fertilitzants.

Els resultats d'aquestes aplicacions permeten concloure:

- La possibilitat de determinar les impureses aniòniques mitjançant Cl permetrà actualitzar el grau de coneixement sobre la presència de salinitat en productes d'adoberia.
- La quantificació de formiat en mostres d'àcid fòrmic comercial suposarà una millora perquè fins ara aquesta determinació es realitzava mitjançant volumetria i s'obtenien valors d'acidesa total (fòrmic i impureses).
- El nou procediment HPLC amb detecció directa és una bona alternativa al mètode tradicional Kjeldhal amb reducció per a l'anàlisi de nitrats en fertilitzants. Suposa estalvi de temps tant en la preparació de la mostra com en la determinació.
- La participació en els assajos d'aptitud per a la determinació d'anions en mostres d'aigües residuals ha demostrat la validesa de la metodologia cromatogràfica amb detecció indirecta.

En definitiva, la metodologia cromatogràfica desenvolupada, convenientment validada, és aplicable a productes químics del sector adober, a mostres d'interès ambiental i a mostres d'altres sectors.

L'èxit d'aquestes proves exploratòries motiva futures línies de treball en aplicacions de l'anàlisi de nitrats en fertilitzats de diferents orígens.

Bloc 2. Desenvolupament i validació d'un mètode cromatogràfic per quantificar el crom hexavalent en pells

S'han assolit tots els objectius definits inicialment:

- S'ha desenvolupat un mètode basat en la cromatografia iònica per determinar el contingut de crom hexavalent en mostres de cuir.
- S'han redactat els documents relacionats amb la nova metodologia analítica (PNT de la determinació de crom hexavalent per HPLC i protocols de manteniment i rutines de treball del sistema cromatogràfic, Annexos x i xx respectivament)
- S'ha realitzat un estudi de validació intralaboratori i s'ha contribuït a la validació externa del mètode mitjançant la participació en dos exercicis col·laboratius interlaboratoris. També s'ha contrastat el nou mètode i la norma colorimètrica ISO 17075:2007 a través de l'anàlisi de més de 50 mostres de cuirs comercials.
- S'ha dut a terme una comparació entre ambdós mètodes en relació a la càrrega de treball, el material volumètric i el consum de fungibles i reactius.

Referent al mètode cromatogràfic desenvolupat, es pot concloure que:

- Les condicions cromatogràfiques seleccionades permeten la identificació i la confirmació del crom (VI) com a anió cromat a un temps de retenció de 3-4 minuts.
- El mètode és selectiu. El detector de fotodíodes possibilita la confirmació fiable de la identitat de cromat mitjançant la comparació de l'espectre UV del pic detectat amb el pic estàndard de cromat. No s'ha detectat cap interferència.
- El nou procediment basat en cromatografia iònica simplifica les etapes de manipulació de l'extracte perquè no requereix ni dilucions ni extracció en fase sòlida.

- El límit de detecció és suficientment baix per assegurar el límit de concentració de 3 mg/Kg de crom hexavalent establert en la Norma ISO 17075 i en el Reglament Reach per a aquest paràmetre.
- L'aplicació dels test de significació (Tests F i t) als pendents de les rectes de calibratge construïdes en períodes de temps diferents ha permès comprovar l'estabilitat i la robustesa del calibratge.
- Els resultats dels assajos de recuperació que valoren l'exactitud de la determinació per HPLC es troben dins el rang d'acceptabilitat 80-120 %.
- L'anàlisi comparativa de més de 50 mostres de pells pels dos mètodes mostra resultats propers entre ells, però els resultats per HPLC van ser més precisos que els obtinguts pel mètode espectrofotomètric. Aquesta millora de precisió pot atribuir-se a la simplicitat del mètode cromatogràfic, que disminueix els processos intermedis.
- La validació interlaboratori compleix els criteris d'acceptabilitat establerts per a tots els paràmetres estudiats.
- El exercicis col·laboratius interlaboratoris en què s'ha participat determinen que els valors d'incertesa i de precisió són millors en el mètode cromatogràfic.
- L'anàlisi cromatogràfica no està afectada per les interferències potencials del mètode espectrofotomètric clàssic de la difenilcarbazida, fet que aporta seguretat al mètode disminuint el risc de falsos positius produïts per la deficient decoloració dels extractes de les mostres i la interacció entre els colorants no eliminats i la difenilcarbazida. Per tant, el mètode cromatogràfic està especialment indicat en aquells cuirs amb baixes quantitats de crom (VI) i per a aquelles pells que continguin substàncies interferents que puguin donar lloc a falsos positius o resultats inexactes pel mètode espectrofotomètric.
- El nou mètode, en comparació amb la norma ISO 17075:2007, disminueix la càrrega de treball, escurça el temps de l'anàlisi i redueix la quantitat de residus de laboratori. Aquests avantatges venen donats per la disminució de les

etapes de manipulació de l'extracte i la major automatització del procediment cromatogràfic.

- El procediment cromatogràfic és més econòmic que el colorimètric.

En resum, el nou mètode cromatogràfic ha demostrat ser simple, fiable, robust, altament específic, sensible, reproducible, ràpid i més econòmic que el mètode colorimètric. Tanmateix, compleix amb el límit de quantificació establert per la comissió europea.

Poc abans de dipositar-se aquesta tesi ha estat publicada la nova norma ISO 17075-2:2017, basada en el mètode cromatogràfic desenvolupat. També s'ha publicat una nova versió del mètode colorimètric, la norma ISO 17075-1:2017, de forma que coexisteixen dos normes internacionals ISO diferents, una cromatogràfica i una espectrofotomètrica. Convé destacar que l'organització ISO indica el següent: "Si una mostra de cuir es prova amb les normes ISO 17.075-1 i ISO 17.075-2, els resultats obtinguts amb el mètode cromatogràfic es consideren com a referència. L'avantatge del mètode HPLC és que no hi ha interferències degut al color de l'extracte".

Aquest criteri s'aplicarà en els casos de falsos positius, com els presentats en la secció 8.12.2, per resoldre el conflicte entre els resultats diferents proporcionats per les dues normes, en aquelles mostres particulars.

Els bons resultats obtinguts plantegen futures aplicacions del procediment cromatogràfic en la determinació de crom hexavalent en colorants de complex metàl·lic i en altres matèries primeres consumides en el sector.

9.2. Difusió dels resultats

La difusió dels resultats de la tesi s'ha dut a terme mitjançant la publicació d'articles i la participació en congressos. D'altra banda, la recerca sobre la determinació de crom hexavalent en pells ha participat activament en el Comitè Tècnic CEN/TC289-WG1 que redacta les propostes de nous mètodes ISO i per aquest motiu ha generat la publicació de varis projectes de norma.

Articles publicats:

- Determination of hexavalent chromium in leather by ion-exchange chromatography. J. Font, C. Pérez, M. Reyes, M. Cobos, F. Combalia, A. Marsal. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, JSLTC*, vol. 98 , núm.4, 151-157, 2014
- New methodology to determine hexavalent chromium in leather. J. Font, C. Pérez, A. Marsal. *International Leather Maker*. Maig/juny 2015, 49, 2015
- Aplicaciones de la cromatografía iónica en curtidos. Parte 1 /Applications of the ion chromatography in the leather sector. Part1. C. Pérez, M. Reyes, N. Pascual, M. Cobos, J. Ibáñez, R. Molina, J. Font. *Journal of AQEIC*, vol. 66, núm. 2, pàgs. 19-24, 2015
- Aplicaciones de la cromatografía iónica en curtidos. Parte 2 /Applications of the ion chromatography in the leather sector. Part 2. C. Pérez, M. Reyes, N. Pascual, M. Cobos, J. Ibáñez, R. Molina, J. Font. *Journal of AQEIC*, vol. 66, núm. 3, pàgs. 41-50, 2015

Ponències en congressos:

-Nuevas aplicaciones de la cromatografía iónica en el sector de curtidos (ponència i comunicació). 61 Congreso de la Asociación Química Española de la Industria del Cuero (Mayo de 2012).

La comunicació es pot consultar a: <http://upcommons.upc.edu/handle/2117/15918>

-Avances en la determinación del cromo hexavalente en cuero. 63 Congreso de la Asociación Química Española de la Industria del Cuero (Septiembre de 2014)

-Novedades en la normativa para la determinación de cromo hexavalente en piel.

64 Congreso de la Asociación Química Española de la Industria del Cuero (Mayo de 2016)

La participació en el grup de treball creat pel Comitè Tècnic CEN-TC289 en col·laboració amb IULTCS, ISO i CEN ha contribuït a la publicació dels següents documents normatius:

-Nou projecte de norma europea/norma ISO:

- ISO 17075-2-DIS-draft Chemical determination of Cr(VI) content in leather - Part 2; Chromatographic method. Setembre 2014.

-Norma ISO en desenvolupament:

- ISO/DIS 17075-2 Chemical determination of Cr(VI) content in leather - Part 2; Chromatographic method. Març de 2015.

-Norma ISO en estat d'esborrany final:

- ISO/FDIS 17075-2 Chemical determination of Cr(VI) content in leather - Part 2; Chromatographic method. Juny de 2016.

-Norma ISO:

- ISO 17075-2:2017 (IULTCS/IUC 18-2). Leather - Chemical determination of chromium(VI) content in leather - Part 2; Chromatographic method. Febrer de 2017.

Les publicacions i els programes dels congressos es poden consultar a l'Annex 8.

Referències bibliogràfiques

1. Font, J. *Análisis y ensayos en la industria del curtido*. Igualada: Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica d'Igualada, 2008.
2. Swartz M. An Overview and Recent Developments. *LCGD North America*. [En línia] 2010, vol. 28, núm. 7, p530-538. Chromatographonline.com. Ion Chromatogr. 2010; [Consulta: 1 / 1 / 2011]. Disponible a: <http://www.chromatographyonline.com/ion-chromatography-overview-and-recent-developments>
3. Trujillo E. et al. Evaluación de la Cromatografía Iónica para Fomentar su uso en la Investigación y Estudios de Posgrado en Ciencias del Agua. *Formación Universitaria. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ingeniería*. 2009, vol. 2, núm.1, p. 7-16
4. Claves en HPLC. *Química Informa .Boletín del Centro de Investigación y Desarrollo en Química y Petroquímica del INTI*. [En línia] . Mayo 2002, vol. 9, núm. 1, p.6 [Consulta: 1 / 1 / 2011]. Disponible a: www.inti.gov.ar/quimica/quimicainforma/pdf/mayo2002.pdf
5. Harris D.C. *Análisis químico cuantitativo*. 3ª ed. Barcelona: Editorial Reverté, 2007. ISBN 970-625-003-4
6. Michalski R. Ion Chromatography as a Reference Method for Determination of Inorganic Ions in Water and Wastewater. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2006, vol. 36, núm. 2, p. 107-127.
7. ISO. ISO 13365:2011: *Determination of preservative content (TCMTB-OPP- CMK-OIT) in leather*.
8. Font, J. et al. Determination of TCMTB and other fungicides in leather. *J.Amer.Leather Chem. Ass.* 2011, Vol. 106, p. 341.
9. Font, J. et al. Determination of fungicides in residual tanning floats using Solid Phase Micro Extraction. *J.Amer.Leather Chem. Ass.* 2011, Vol. 106, p. 341
10. ISO. ISO 17075:2007: *Determination of hexavalent chromium content*. 2007.
11. Commission Regulation (EU) No. 301/2014 (25 March 2014). Official Journal of the European Union L 90/1 (26.3.2014) Amendment to Annex XVII to Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the REACH as regards chromium VI compounds.
12. Tegtmeier, D. i Kleban, M. Investigación sobre cromo y cuero. *J. AQE/C*. 2014, Vol. 65, núm. 1, p. 1.

13. Black, M., et al. Best available techniques (BAT) reference document for the tanning of hides and skins. *European Commission Database*, 2013, vol. 46.
14. Retirados 53 modelos por su alto contenido en cromo. LederPiel [en línia]. 2015, Vol. 152, p. 19. Disponible a:
https://issuu.com/mundipress/docs/binder1_25ec42091f22af.
15. Facua alerta del riesgo de alergias e intoxicación en más de medio centenar de modelos de calzado . *Expansión* [en línia]. [Consulta: 10 octubre 2015].
Disponible a:
<http://www.expansion.com/sociedad/2015/09/03/55e88297268e3e74308b4596.html>.
16. Milacic R, Scancar J, Urbanc M. Formation, prevention and determination of Cr(VI) in leather. *J. Soc Leather Technol Chem*. 1998 , Vol. 82, p. 91-94.
17. Font, J. et al. Presence of chromium (VI) in sheepskins: influence of tannery processes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 1999, vol. 83, núm. 2, p. 91-95.
18. Kalender, D. A., Yenigül, B. and Ertas FN. A sensitive voltammetric method for chromium (VI) in presence of chromium (III) and its application to leather. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*.. 2011 , Vol. 95, núm. 4, p. 152-157.
19. Zhengxin, Z. et al. Determination of Cr(VI) content in leather with anodic stripping voltammetric polarography. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. 2011, Vol. 95, núm. 6, p. 255-258.
20. Wang, L. et al. Reverse Reference Flow Injection Spectrophotometry for the Determination of Chromium(VI) Extracted from Leather by Artificial Perspiration. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. 2012, Vol. 90, núm. 4, p. 152-156.
21. Wang, L. et al. Flow Injection Spectrophotometric Determination of Chromium(VI) Extracted from Dyed Leather with On-Line Decolouring. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*.. 2012, Vol. 90, núm. 4, p. 152-156.
22. Ministerio de Medio Ambiente. Guía de mejores técnicas disponibles en España del sector de curtidos. Grup Carles: 2003.
23. AQEIC. Análisis de los principales descalcantes: *Bol. AQEIC*. 1961, Vol. 12, p. 301.
24. Vogel A. Química Analítica Cuantitativa. Buenos Aires: Ed.Kapeluz; 1960.
25. Font, J.; Hinojosa D. Determinación de aniones por electroforesis capilar. *Bol. AQEIC*. 1996, núm. 47, p. 35.

26. Casares J. *Tratado de Análisis Químico*. Madrid Editado por el autor; 1956.
27. Kolthoff, I. M. , *Análisis Químico Cuantitativo*. 5ª Ed. Buenos Aires: Ed. Nigar; 1979.
28. Berenguer, J. Nuevas gamas de colorantes para satisfacer las necesidades del curtidor. *Bol. AQEIC*. 2005, Vol. 56, núm. 2, p. 81-84.
29. ISO. Standards Catalogue. IULTCS - International Union of Leather Technologists and Chemists Societies [en línia]. [Consulta: 24 novembre 2016]. Disponible a: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_tc_browse.htm?com mid=55240.
30. Chonan, Y. et al. Ions eluted from leathers and their corrosiveness to metals. *JALCA*, 1992, núm. 87, p. 409-418.
31. Romano, J. et al. Optimization of inorganic capillary electrophoresis for the analysis of anionic solutes in real samples. *Journal of Chromatography A*. 1991, Vol. 546, p. 411-421. ISSN 00219673.
32. Jones W.R.; Jandik P. Various approaches to analysis of difficult sample matrices of anions using capillary ion electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1992, Vol. 608, núm. 1, p. 385-393. ISSN 00219673
33. Depósito de documentos de la FAO. *Departamento económico y social. Cueros y pieles sin curtir y cuero curtido: Estrategia para su desarrollo* [en línia]. Tanzania: febrer 2006 [Consulta: 10/12/2010]. Disponible a: <http://www.fao.org/docrep/meeting/010/j6530s.htm>. 2006.
34. Rodríguez, A. *Manual de las Tecnologías Limpias en PyMES del sector Curtiembres*. Organización de Estados Americanos. Programa Horizontal de Tecnologías Limpias y Energías Renovables. Març 2006.
35. Vila M. La evolución de la industria de curtidos, disminución de la contaminación, sistemas de depuración, ahorro y recirculación de agua, y tecnologías emergentes. *European Science & Technology Week*. Noviembre de 2002. p.12
36. European Commission. *Reference Document on Best Available Techniques for the Tanning of Hides and Skins. Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC)* . [en línia]. 2013. Disponible a: http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/TAN_Adopted552013.pdf.
37. International Union of Leather Technologists and Chemists Societies (2008) IUE Document on recent developments in cleaner production and environment protection in world leather sector.

38. Generalitat de Catalunya (Departament de Medi Ambient). La qualitat ambiental en el sector de les adoberies [En línia]. [Consulta: 10/12/2009]. Disponible en: www.mediambient.gencat.cat/cat/el_departament/actuacions_i_serveis/publicacions/cema/fitxes_territorials/06.pdf
39. Generalitat de Catalunya (Departament de Medi Ambient). Casos pràctics de qualitat ambiental al sector de les adoberies [en línia]. [Consulta: 10/12/2009]. Disponible a: www.mediambient.gencat.cat/cat/el_departament/actuacions_i_serveis/publicacions/cema/fitxes_territorials/07.pdf
40. Marsal A. et al. Salinity Reduction in the production of nappa skins by using agents with non-swelling capacity in pickling/tanning. *JSLTC*, 2005, vol 89, núm. 6, p. 232-236; ISSN 0144-0322
41. Mata, J; Crivillé A. Oportunidades para la minimización de los residuos producidos por la industria del curtido. *AQEIC*. 1996, Vol. 3, p. 110-115.
42. Martí J. Apunts del màster Enginyeria del Cuir. UPC. Igualada. 2009.
43. Flores G. Una ribera ecoeficiente. *AQEIC*, Enero/Febrero/Marzo de 2002., núm1. p.35-43
44. Salmeron Egea, J.; Salmeron Espinosa J. El problema de la salinidad en el vertido de las tenerías. La salinidad en el sector de la piel. *Jornada Técnica de AQEIC*. 2004 p. 47.
45. Cambra, M. et al. Experiencia de la Unidad de Curtidos de INESCOP en la reducción de la salinidad. *AQEIC*. Enero/Febrero/Marzo de 2006, Vol. 1, p. 14-19.
46. Thanikaivelan, P. et al. Recent trends in leather making: processes, problems, and pathways. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2005, vol. 35, núm. 1, p. 37-79.
47. ACA (Agència Catalana de l'aigua). El cànon de l'aigua aplicable als usos de caràcter industrial. [en línia]. [Consulta: 12/12/2009]. Disponible a: https://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P1215454461208200958970
48. Catalunya. Decret Legislatiu 3/20003, de 4 de novembre, pel qual s'aprova el Text refós de la legislació en matèria d'aigües de Catalunya. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya, 21 de novembre de 2003, núm.4015, p. 22823.
49. Salmeron J. Reducción de la contaminación en los procesos de ribera. *AQEIC*. Vol. 3, p. 150-157.
50. AQEIC. Estudio de la aplicación de las mejores tecnologías disponibles (BAT's) para el sector de curtidos. *AQEIC*. 2006, Vol. 1, p. 34-42 .

51. Pampín, R. M. *Producción limpia en la industria de curtiembre*. Univ Santiago de Compostela, 2007.
52. Bacardit, A. *Sistemes Ecològics d'Adobament al crom*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona, Departament d'Enginyeria Química i Metallúrgica., 2005, p.54 [en línia] [consulta:20/07/10]. Disponible a: <http://www.tdx.cat/TDX-0513109-090720>
53. Espanya. Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. Boletín Oficial del estado, 30 d'abril de 1986. p.15500 a 15537
54. Eaton A.D. et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater . 21 ed. USA: American Public Health Association, 2005.
55. AENOR. Asociación Española de Normalización. [En línia] [Data: 10/12/2010] .Disponible a: <http://www.aenor.es/aenor/inicio/home/home.asp>.
56. Fiehn, O.; Wegener, G. Capillary Electrophoretic Analysis of Organic Anions in Tannery Wastewater Including High Contents of Chloride and Sulfate. *Journal Of Environmental Analytical Chemistr.*,1998, vol. 69, núm 3, p. 257 -271
57. Lingnyun Y. et al. Simultaneous determination of choride and sulfide in tannery effluents by low pressure ion-exclusion. Chromatography with post-column spectrophotometric detection. *JSLTC*. 2009, vol.94 núm. 6, p.220-224.
58. Li, B. et al. Determination of chloride and sulphate ions in leather picking liquor by low-pressure ion chromatography. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. 2004, vol. 88, núm. 1, p. 6-9.
59. Yonghong, X. et al. A fast method for determination of sulfate in tannery waste water. *Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists*, November/December 2006, vol. 90, núm. 6, p 235-238, ISSN: 01440322
60. Yonghong, X. et al. A reliable method to determine sulfide in tannery effluent.. *Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists*. 2007,vol. 91, núm. 1, p 21-24.
61. Lingyun, Y. et al. On-line flow injection spectrophotometric determination of chloride ion in tannery effluent . *Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists..* 2009, Vol. 93, núm. 2, p.46-50.
62. Moretto, A. Hexavalent and trivalent chromium in leather: What should be done? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2015. vol. 73, núm. 2, p. 681-686.
63. Sastre, J. A. *Tecnologías para la sostenibilidad: procesos y operaciones unitarias en depuración de aguas residuales*. EOI Esc. Organiz. Industrial, 2005. ISBN 978-84-88723-58-1

64. Font, J.; Marsal, A. *Libro de calidad para la producción de piel y cuero libre de Cromo (VI)*. 2006.
65. Pourbaix, M. *Atlas d'équilibres électrochimiques*. Paris: Gauthier-Villars & Cie. 1963.
66. Matias, V. O. (2010). *Historically accurate reconstructions and characterisation of chrome yellow pigments*. 2010. Tesis Doctoral. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa. [En línia]. [consulta:20/07/14] Disponible a: <http://hdl.handle.net/10362/5331>
67. Font, J. et al. Chrom6less Project "Prevention of chromium (VI) formation by improving the tannery processes", funded by the European Community, Craft Contract no. G1ST-CT-2002-50264.
68. INESCOP. Prevención del cromo hexavalente en pieles para calzado. Ficha resultados 2015, [en línia]. [consulta:20/08/16] Disponible a: http://www.inescop.es/0servidor0/inescop/medioa/CROMOHEX-Ficha_resultados_2015.pdf.
69. Commission Regulation (EU) No. 348/2013 (17 April 2013). Official Journal of the European Union L 108/1 (18.4.2013) Amendment to Annex XIV to Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the REACH.
70. Commission Regulation (EU) No. 301/2014 (25 March 2014). Official Journal of the European Union L 90/1 (26.3.2014) Amendment to Annex XVII to Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the REACH as regards chromium VI compounds.
71. Skoog, D.; West, D. i Holler, J. *Fundamentos de Química Analítica*. 4ª ed. Ed. Reverté, 1997.
72. Skoog, D. i J., Leary. *Análisis Instrumental*. 4ªed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A, 1995.
73. Casas Sabata, J.M. *Anàlisi Instrumental*. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya, 1994.
74. Harvey, D. *Química Analítica Moderna*. 1ª ed. Mc Graw-Hill, 2002.
75. Menéndez, F. *Higiene Industrial. Manual para la formación del especialista*. 8ª ed. Lex Nova S.A, 2008.
76. Hernández, L. *Introducción al análisis instrumental*. 1ªed. Barcelona: Ariel ciencia, 2002. p.25-31.

77. Willard, H. et al. *Métodos Instrumentales de Análisis*. México: Grupo Editorial Iberoamericano, 1991.
78. Valcárcel, M. *Principios de Química Analítica*. Barcelona: Springer, 1999. ISBN: 9788407005002
79. Harris D. C. Analisis químico cuantitativo. 3a edición. México:Grupo Editorial Iberoamericano,1992.
80. Natishan T. K.; Sajonz P. Acetate and chloride determination by ion exchange HPLC with indirect photometric detection and its application to a beta-metilcarbapenem antibiotic. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2001, ol. 24, núm.15, p. 2583-2599.
81. Pacakova, V.; Stulik K. *Capillary Electrophoresis/ Low-Molecular-weight Ions. Encyclopedia of Analytical Science*, 2005, p.354-361.
82. La cromatografía iónica, método analítico universal para el sector farmacéutico. *Técnicas de laboratorio*, núm. 388, 2014, p.28-30.
83. Jeevan, R.J.G. et al. A reliable detection method for Cr(VI) in dyed leathers by ion chromatography. *The Journal of the American Leather Chemists Association*, 2003, Vol. 98, núm. 9, p. 344-350. ISSN 0002-9726.
84. Metrohm. *El programa de columnas Cl*. Suissa:2008;
85. Peterson, J. e al. ASE of Chromium(VI) from Leather Glove Samples with Ion Chromatography Analysis [en línia]. 2007. [consulta:20/07/14]. Disponible a: <http://www.chromatographyonline.com/ase-chromiumvi-leather-glove-samples-ion-chromatography-analysis>.
86. Jinshui, Ch. et al.. *Simultaneous Determination of Trivalent Chromium and Hexavalent Chromium Using Accelerated Solvent Extraction and Ion Chromatography*. Thermo Sci. 2014.
87. Barquero Quiros, M. *Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía líquida de alto desempeño*. Universidad de Costa Rica, San Jose (Costa Rica). Facultad de Ciencias, 2004.
88. Butt SB, Riaz M. Determination of Cations and Anions in Environmental Samples by HPLC: Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2009, vol. 32, núm. 8, p. 1045-1064.
89. Small H. *Ion Chromatography*. New York: Plenum Press, 1989. p.195-204.
90. Small H, Stevens S. Indirect Photometric Chromatography. *Anal.Chem*, 1982, Vol. 54 ,núm. 3, p. 462-469.
91. Lindsay, S. High performance liquid chromatography . Analytical Chemistry by Open Learning. 2ª ed. Londres: Thames polytecnic,1987,

92. Fuentealba F. el alt. Slideshare.net. Técnicas bioquímicas:cromatografía de intercambio iónico .[en línea] Universidad Catolica de la santísima Concepcion. Facultad de Medicina, departameto de bioquímica.es. Junio 2010.[Consulta 12/11/2010],p.4-8-Disponible a:
<https://es.slideshare.net/valentinapaz90/cromatografia-de-intercambio-ionico>
93. Ions Exchange basics, 18/10/10, [en línea]. [Consulta: 12/12/2010]. Disponible a:
<http://dardel.info/IX/>
94. Swartz, M. HPLC Detectors: A brief Review. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies.*, 2010, Vol. 33, núm. 9, p. 1130-1150.
95. AENOR. Calidad del agua. Determinación de aniones disueltos por cromatografía de iones en fase líquida. Parte 1.Determinación de bromuro, fluoruro, nitrato, nitrito, fosfato y sulfato. UNE-EN ISO 10304-1:2009. Madrid: AENOR, 2009.
96. Gennaro, A.R. *Remington Farmacia*. Ed. Médica Panamericana, 2003. p.707.
97. Baird, C. *Química ambiental*.Reverté, 2001, p.441.
98. M.A.Sánchez; Vilanova,E. *Técnicas analíticas de contaminantes quimicos aplicaciones toxicologicas, medioambientales y alimentarias*. Ediciones Díaz de Santos, 2004, p.160.
99. Beltran, J. et al. Analisis de residus de plaguicidas en productos agroalimentarios por tecnicas cromatograficas. *Cromatografía y técnicas afines*, 1990, vol.11, núm.1 p.11-20.
100. Shen, X.; Sterling A. Indirect Photometric and fluorometric Detection in High-Performance Liquid Chromatography: A Tutorial Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2007, vol. 37, núm. 2, p.107-126.
101. Crawford Scientific (Traducción Grupo Biomaster 2009). *Incidencias y mantenimiento en HPLC* [en línea]. 2007. [Consulta: 12/12/2015]Disponible a:
http://www.grupobiomaster.com/pdf/LC-13_Incidencias_y_Mantenimiento_en_HPLC.pdf
102. Waters.Waters Alliance Systems for Ion Chomatography (IC) Analysis [en línea]. [Consulta: 10/01/2010]. Disponible a:
<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000138en.pdf>.
103. Ohta, K.;Tanaka, K.. Simultaneous determination of common inorganic anions, magnesium and calcium ions in various environmental waters by indirect UV-photometric detection ion chromatography using trimellitic acid-EDTA as eluent . *Analytica chimica acta*, 1998, vol. 373, núm. 2, p. 189-195.
104. Haddad, P.; Jackson,P. *Ion chromatography: principles and applications*. 1a edició, Elsevier, 1990. p.351-360.

105. Sherwood J.; Fritz, D. *Ion chromatography*. Wiley-VCH, 2009, p. 164-166.
106. Weiss, J. *Ion chromatography*, 2a edició, VCH, 1995 p.315-320.
107. Poole, C.F. *The essence of chromatography*. Elsevier, 2003, p.490.
108. Hayakawa K.; Yamamoto A. Advances of indirect photometric detection in liquid chromatography. *Bunseki Kagaku-Japan Analyst*, 1995, vol. 44, núm. 6, p. 436-436.
109. Lazar S, Herbreteau B, El Haddad M, Lafosse M, Akssira M, Dreux M. Interest of indirect photometric detection in liquid chromatography of inorganic anions in natural waters. *Analisis*, 1999, Vol. 27, núm. 10, p. 882-884. ISSN 0365-4877.
110. Li, W.; Rossi, T. M. Determination of sulfamate and sulfate as degradation products in an antiepileptic drug using ion chromatography and indirect UV detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1995, vol. 18, núm. 5, p. 917-923.
111. Pizzoferrato L, Di Lullo G, Quattrucci E. Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry-HPLC. *Food Chem*, 1998, Vol. 63, núm. 2, p. 275-279. ISSN 03088146.
112. Dorland P, Tod M, Postaire E, Pradeau D. Indirect detection of inorganic anions by high-performance liquid chromatography: Use of papaveraldinium as an ultraviolet absorbing agent. *Journal of Chromatography*. 1989, Vol. 478, p. 131-140. ISSN 00219673
113. Takeuchi T, Zein R, Munaf E, Miwa T. Indirect photometric detection of inorganic anions in microcolumn ion chromatography using octadecylsilica immobilized with bovine serum albumin as stationary phase. *Journal of Chromatogr A*, 1996;755(1):37-42.
114. Fröhlich, D.H. HPLC of anions on coated reversed phase columns using indirect UV-detection and eluents containing nitrophthalic acids. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1987, Vol. 10, núm. 1, p. 12-16. ISSN 0935-6304.
115. Barkley, D.J., Dahms, T.E. i Villeneuve, K.N. Permanently coated ion exchangers for liquid chromatographic determination of anionic species in samples from environmental control processes. *Journal of Chromatography*, 1987, Vol. 395, p. 631-640. ISSN 00219673.
116. Barkley, D.J. et al. Study of permanently coated columns for the high-performance liquid chromatographic determination of sulphur anions in environmental samples from metallurgical processes. *Journal of Chromatography*, 1993, Vol. 642, núm. 1-2, p. 371-377. ISSN 00219673.

117. Fung, Y.; Dao,K.L. Oxygen bomb combustion ion chromatography for elemental analysis of heteroatoms in fuel and wastes development. *Analytica Chimica Acta*, 1995, vol. 315,p. 347–355.
118. Fung, Y.; Dao KL. Elemental analysis of chemical wastes by oxygen bomb combustion-ion chromatography. *Anal Chim Acta*, 1996, Vol. 334, núm. 1-2, p. 51-56. ISSN 00032670.
119. Woolfson-Bartfeld, D. et alt. Reversed-phase ion-pair cromatography with indirect photometric detection of inorganic anions from residues of low explosives. *Journal of Chromatography*, 1990,vol.517, p.305–315.
120. Takeuchi, T. et al. Indirect photometric detection of inorganic anions in micro high-performance liquid chromatography with permanently coated columns. *Journal of Chromatography*, 1998, vol.447 , p.221–224.
121. Hordijk, C.A. et alt. Analysis of sulfate at the mud-water interface of freshwater lake sediments using indirect photometric chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 1984, vol.2, p.49–56.
122. Cooke,M. Determination of nitrate in water by microbore HPLC. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communication*, 1983, vol. 6, p.383–385.
123. Maki, A.; Danielson, D. Comparison Study between Indirect Photometric and direct Conductivity Detection for Anion Exchange Chromatography Using Naphtholdisulfonate. Derivatives al Mobile Phases. *Journal of Chromatographic Science*, 1992,vol.33, num.1/2, p. 25-31.
124. Cochrane,R.A.; D.E. Hillman. *J.Chromatogr*, 1982, vol. 241, núm.392
125. Haddad P.R., Heckenberg A.L. *J.Chromatogr*. 252,177 (1982).
126. Y.Miura, J.S.Fritz, *J. Chromatogr*. 482,155 (1989).
127. Muentner MM, Stokes KC, Obie RT, Jezorek JR. Simultaneous separation of inorganic ions and neutral organics on ion-exchange stationary phases. *Journal of Chromatography*, . 1999, Vol. 844, núm. 1, p. 39-51. ISSN 00219673.
128. AENOR. Calidad del agua. Determinación de aniones disueltos por cromatografía iónica en fase líquida. Parte 3: Determinación de cromato, ioduro, sulfito, tiocianato y tiosulfato. (ISO 10304-3:1997). Madrid: AENOR, 1997.
129. Yu, R. et al. Simultaneous determination of trivalent chromium and hexavalent chromium in plastics by accelerated solvent extraction-ion chromatography. *Se pu= Chinese journal of chromatography*, 2012, vol. 30, núm 4, p. 409-413.

130. Aguirre, L. et al. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. *Validación de Métodos Analíticos: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria*, 2001.
131. Zumbado, H. *Análisis químico de los alimentos: métodos clásicos*. Ciudad de la Habana, Cuba: Editorial Universitaria., 2002.
132. Cámara, C.; Pérez-Conde, C. *Análisis químico de trazas*. Editorial Síntesis., 2012 . ISBN 9788499586069
133. Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* .1ª ed, 2016. Disponible a: www.eurachem.org1590.
134. AENOR.. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 . Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Madrid: AENOR, 2005
135. Thompson, M. et al. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 2002, vol. 74, núm. 5, p. 835-855.
136. Chaloner-Larsson, G. et al. *Guía de la Organización Mundial de la Salud sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Segunda parte. Validación*. Ginebra. Suiza:OMS, 1998. [en línea]. Consultat: 2/07/2016. Disponible a: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64975/2/WHO_VSQ_97.02_spa.pdf
137. Comisión del Codex Alimentarius. *Manual de procedimiento. 23 edición. Roma: Publicado por la Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, 2015*. ISBN 9789253087037.
138. Vinagre, J. Calidad de métodos analíticos (Capítulo 13). F.A.O. *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Santiago de Chile: Universidad de Chile. Santiago de Chile*, 1997 , [en línea]. Consultat 3/06/2016. Disponible a: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s00.htm>
139. RPS-Qualitas. *Ensayos de intercomparacion- Proficiency Test*. Consultoría de Calidad y Laboratorio S.L . [en línea] Consultat 3/06/2016. Disponible a: http://www.rpsqualitas.es/documentacion/downloads/ensayos/ensayos_de_intercomparacion.pdf
140. Valcárcel, M.; Ríos, A. *La calidad en los laboratorios analíticos*. Barcelona: Editorial Reverté, 1992. ISBN: 9788429179866
141. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. *The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*. 2006, Vol. 78, núm. 1, p. 145-196. ISSN 0033-4545.

142. Boqué, R. La selectividad en Análisis Químico. Grupo de Quimiometría. Tarragona: Universidad Rovira i Virgili, 2001, p. 1-8. [en línia]. Consultat 3/06/2016. Disponible : <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/selectividad.pdf>
143. Martin-Smith M, Rudd DR. The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals. *Acta Pharm Jugoslavica*, 1990, vol. 40, núm. 1-2, p.7-19.
144. Blanco, M., Cerdà, V. *Temas avanzados de quimiometría*. 1ª edició. Palma: Universitat de les Illes Balears, Servei de Publicacions i d'intercanvi científic, 2007. ISBN 987-84-8384-006-1.
145. Riu, Jordi, and Ricard Boqué. "Calibración lineal." *Técnicas de laboratorio*-Barcelona, 2003, p. 676-681. [en línia]. Consultat 3/06/2016. Disponible a: <http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/callin.pdf>
146. Gold, V.et al. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* [en línia]. 2014, p. 1670. ISSN 0033-4545. Disponible a: <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf%5Cnhttp://goldbook.iupac.org/I03352.html>.
147. Guiochon, G.; Guilemin, C. L. *Quantitative gas chromatography*, 1988, editorial Elsevier.
148. Armbruster DA, Tillman MD, Hubbs LM. Limit of detection (LOD)/limit of quantitation (LOQ): Comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clinical Chemistry*. 1994, Vol. 40, núm. 7 I, p. 1233-1238. ISSN 00099147.
149. Latimer, G. W. AOAC International., Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. Official methods of analysis of AOAC International, 2012.
150. Guiteras, J.; Rubio,R.; Fonrodona, G. *Curso experimental en química analítica*. Editorial Síntesis, 2003. ISBN: 9788497560726
151. Skoog, D. *Principios de Analisis Instrumental*.6a ed. Reverté,2008, p.374.
152. Waters. IC-Pak Column and Guard Column. Care and use Manual. [en línia] [consulta:20/01/09]. Disponible a: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/wat091064.pdf>
153. C.S.I.C. Cromatografía líquida de alta eficacia. [en línia] [consulta:20/01/16]. Disponible a: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf

154. Subirats, X. Solvents orgànics en electroforesi capil·lar i cromatografia de líquids. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona, Departament de Química Analítica, 2007. capítol 1, pàg. 13-17[en línia] [consulta: 20/01/10]. Disponible a :<http://www.tdr.cesca>.
155. Dolan J. HPLC Solutions #26: Buffer Lifetime. Dolan, J. HPLC Solutions #26: Buffer Lifetime. : [en línia] [consultat 2/02/2014]. Disponible a: <https://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/311-/HPLC-Solutions-26-Buffer-Lifetime>
156. Sagarra E. Consejos y trucos para el mantenimiento de su HPLC-GC. [en línia]. Disponible a: http://www.agilent.com/cs/library/training/Public/Consejos_Esther.pdf
157. Poole CF, Poole SK. *Cromatography today*. Amsterdam: Elsevier, 1991.
158. González J.M, Universidad del País Vasco-CSIC [en línia] .Curso de biomoléculas.[Consulta:5/06/10].Disponible a :<http://www.ehu.es/biomoleculas/buffers/buffer1.htm>. .
159. Jardy A, Caude M, Diop A, Curvale C, Rosset R. Single-column anion chromatography with indirect uv detection using pyromellitate buffers as eluents. *Journal of Chromatography*. 1988, Vol. 439, núm. 1, p. 137-149.
160. Hinojosa D. Determinació d'anions per electroforesi capilar. UPC. Projecte final de carrera. EUETII.
161. Symposium AIIICA. Acabados moda de piel al cromo y al vegetal. Igualada 1993.
162. Francina Izquierdo; Cap del departament d'investigació. Empresa: Pulcra. Consulta via e-mail el 28 d'octubre de 2013.
163. Horwitz, W., 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry* . Vol. 54, p. 67A-76A.
164. Elcacho , J. El 52% dels rius incompleixen la directiva de qualitat de la UE. El punt. 22/10/10.[en línia] [consulta:20/12/10]. Disponible a: <http://www.elpunt.cat/noticia/article/1-territori/11-mediambient/319879-el-52-dels-rius-incompleixen-la-directiva->.
165. Els purins segueixen contaminant les aigües subterrànies de la Plana de Vic. El periódico.cat, 20 de desembre de 2010.[en línia] [consulta:20/01/11]. Disponible a: <http://www.elperiodico.cat/ca/noticias/societat/20101220/els-purins-segueixen-contaminant-l>.
166. Elcacho , J. Unes 100.000 persones reben aigua contaminada pels purins. Els residus de les granges de porcs afecten el 7% de les xarxes [en línia] [consulta:20/01/11]. Disponible a: www.edu365.cat/aulanet/comsoc/noticies/aigua/aigua_purins.pdf.

167. La Generalitat amplia les zones vulnerables de contaminació per nitrats per fonts agràries Manresainfo.cat, 28/07/2009 . [en línia] [consulta:20/12/10].
Disponible a:
<http://www.naciodigital.cat/manresa/noticia/6742/generalitat/amplia/zones/vulnerables/co>.
168. Tanquen el pou que subministra aigua als Prats de Rei per una possible contaminació de purins. 3.cat24.cat , 13/06/2008.[en línia] [consulta:20/12/10].
Disponible a:<http://www.3cat24.cat/noticia/287255/anoia/Tanquen-el-pou-que-subministra-aigua-als-Prats->.
169. Les anàlisis confirmen que la contaminació del pou d'aigua dels Prats de Rei es deu a purins.3.cat24.cat,16/06/2008,.[en línia] [consulta:20/12/10]. Disponible a:<http://www.3cat24.cat/noticia/287925/anoia/Les-analisis-confirmen-que-la-contaminacio-del-pou>.
170. Herrera, G.M. et al. Estandarización de la difenilcarbazida como indicador y acompanyante en la identificación de cromo hexavalente-Cr (VI). *Producción+ Limpia*, 2013, vol. 8, no 2, p. 9-20.
171. Romero C, Pellerano R. Estandarización condiciones preliminares para la determinación de cromo en muestras ambientales. *Labquiam*, 2006, núm. Vi, p. 1-4
172. ISO. ISO/FDIS 17075-2:2016. Chemical determination of chromium (VI) content in leather - Part 2: Chromatographic method (ISO/FDIS 17075-2:2016).
173. Comunicació privada del Dr. Joaquim Font, Igualada Maig de 2016.
174. ENAC. Guía para la expresión de la incertidumbre en los ensayos cuantitativos [en línia]. 2005, p. 1-21. Disponible a:
<http://www.enac.es/documents/7020/7a74c65a-199b-463e-adbf-b23f941c2a38>.
175. Riu, J.,et al. Exactitud y trazabilidad. *Técnicas de Laboratorio*, 2000, vol. 22, núm. 254, p. 591-594

Índex de taules

Taula 1. Principals productes emprats en les etapes d'adoberia. Anions i efluents generats....	14
Taula 2. Relació de controls analítics en productes d'adoberia que presenten algun component aniònic (1).....	16
Taula 3. Relació de mètodes oficials relacionats amb l'anàlisi química de substàncies aniòniques en el cuir (1,29).....	20
Taula 4. Origen dels anions clorur i sulfat en els abocaments aquosos d'una adoberia	24
Taula 5. Toxicitat del Cr(III) i Cr (VI) i equilibris químics dels cations de crom segons Tegtmeier D. i Kleban M.(12).....	29
Taula 6 .Resum de les directrius per prevenir la formació de crom hexavalent en el procés de fabricació i en la pell adobada (11,12,50,67,68)	31
Taula 7. Classificació general dels intercanviadors iònics	40
Taula 8.Resum d'algunes aplicacions de la detecció fotomètrica indirecta d'anions inorgànics per HPLC recollides a la revisió de Shen (100)	50
Taula 9. Principals eluents per determinar cromat per CI en diferents mostres.....	53
Taula 10. Principals anions d'adoberia susceptibles d'ésser analitzats per CI.....	67
Taula 11. Condicions inicials seleccionades per a les proves preliminars.....	80
Taula 12. Temps de retenció dels patrons a concentracions de 40 ppm segons les condicions cromatogràfiques de la Taula 11.....	83
Taula 13. Influència de la temperatura sobre el temps de retenció (fase mòbil hidrogen ftalat potàssic 2m M amb un 8% d'acetonitril i pH 5,2, 260nm)	87
Taula 14.Nombre de plats teòrics a diferents temperatures per als analits assajats.....	87
Taula 15.Efecte del contingut d'acetonitril sobre el temps de retenció (fase mòbil 2mM ftalat àcid de potassi a pH 5,0. Temperatura 30°C, 15 µL, 260nm)	88
Taula 16.Límits de detecció de diversos anions a diferents concentracions de la fase mòbil....	95
Taula 17. Resum de les condicions òptimes proposades en la detecció indirecta d'anions per CI	98
Taula 18. Temps de retenció dels anions amb fases mòbil biftalat de potassi a diferents concentracions (condicions cromatogràfiques de la Taula 17).....	98
Taula 19. Comparativa del temps de retenció d'alguns anions orgànics i inorgànics	100
Taula 20. Rectes de calibratge detecció indirecta. Fase mòbil: 1 mM en Biftalat potàssic, 8% (V/V) ACN,	101
Taula 21.Rectes de calibratge detecció indirecta. Fase mòbil: 2 mM en Biftalat potàssic, 8% (V/V) ACN,	101
Taula 22.Condicions cromatogràfiques amb la fase mòbil borat- gluconat	105
Taula 23. Dades de les rectes de calibratge dels anions nitrat i nitrit (15µL, 210 nm, 30 °C i fase mòbil borat-gluconat)	107
Taula 24. Condicions cromatogràfiques amb la fase mòbil sulfat sòdic	108
Taula 25. Temps de retenció en les condicions de la Taula 24	109

Taula 26. Rectes de calibratge detecció directa. Fase mòbil: 1mM en sulfato sòdic, 8% (V/V) ACN i pH final $6,8 \pm 0,1$	110
Taula 27. Descripció de les pells analitzades	119
Taula 28. Proposta de procediment d'extracció de matèries solubles en la pell	122
Taula 29. Temps de retenció orientatius	125
Taula 30. Procediments normalitzats d'extracció de matèries solubles en pell.....	130
Taula 31. Procediment d'extraccions lentes i ràpides	132
Taula 32. Resultats de la pell 1 en l'extracció lenta	134
Taula 33. Resultats de la pell 1 en l'extracció ràpida	134
Taula 34. Resultats de la pell 4 en l'extracció lenta	135
Taula 35. Resultats de la pell 4 en l'extracció ràpida	135
Taula 36. Resultats de la pell 6 en l'extracció lenta	136
Taula 37. Resultats de la pell 6 en l'extracció ràpida	137
Taula 38. Resultats de la pell 7 en l'extracció lenta	138
Taula 39. Resultats de la pell 7 en l'extracció ràpida	138
Taula 40. Resultats de extraccions consecutives de la pell 5A (anió analitzat: clorur)	140
Taula 41. Extraccions consecutives de formiat en mostres de pell. Detecció directa. No confirmat: l'espectre no coincideix amb el de formiat, per tant no es pot confirmar la presència d'aquest anió, i això pot ser degut a que hi hagi més d'un analit diferent. (--): No es determina.	142
Taula 42. Extraccions consecutives formiat i/o fosfat en mostres de pell. Detecció indirecta	143
Taula 43. Extraccions consecutives de clorur en mostres de pell. Detecció indirecta.....	143
Taula 44. Extraccions consecutives de sulfat en mostres de pell. Detecció indirecta.	144
Taula 45. Límits de detecció dels anions.....	148
Taula 46. Equivalència entre % RSD de Horwitz i la concentració	149
Taula 47. Reproductibilitat del mètode	150
Taula 48. Repetibilitat del mètode.....	150
Taula 49. Repetibilitat instrumental	151
Taula 50. Estudi de recuperació	152
Taula 51. Preparació de les dissolucions de les mostres	159
Taula 52. Temps de retenció amb fase mòbil biftalat potàssic 1mM amb 8% d'acetonitril, pH $6,2 \pm 0,2$. Temperatura 30°C, 260 nm i detecció indirecta	160
Taula 53. Resultats de l'avaluació de l'efecte del pretractament SPE sobre el contingut aniònic	162
Taula 54. Contingut d'impureses aniòniques (% en pes) en els productes químics analitzats.	162
Taula 55. Comparativa continguts àcid fòrmic (mètode volumètric i mètode cromatogràfic).Concentracions en % m/m	165
Taula 56. Contingut de nitrat (mg/L) en les mostres d'aigües analitzades	168
Taula 57. Dades relatives als estudis interlaboratoris adreçats a l'anàlisi d'aigües	169
Taula 58. Resum de les etapes de la determinació de crom hexavalent en pells.....	176
Taula 59. Temps de retenció obtinguts amb els diferents eluents assajats	187
Taula 60. Límits de detecció per al Cr(VI) a diferents volums d'injecció.....	194
Taula 61. Condicions cromatogràfiques i dades per a la programació de seqüències d'anàlisi en la determinació de crom hexavalent en pell.....	196

Taula 62. Patrons de Cr (VI) pel calibratge	199
Taula 63. Comparativa de diferents rectes de calibratge de Cr(VI)	200
Taula 64. Límits de detecció per al Cr(VI) obtinguts amb el cromatògraf nou i amb dos patrons diferents	204
Taula 65. Comparativa del LOD i LOQ de dos cromatògrafs de diferent edat i obtinguts per injecció de 50 µL de patrons de Cr(VI) de concentracions de l'ordre de 0,05 i 0,02 mg/L	204
Taula 66. Concentracions de Cr(VI) en les mostres de pell	206
Taula 67. volum de patró de Cr(VI) a emprar en el % de recuperació en funció del contingut de crom de la mostra	208
Taula 68. Resultats obtinguts en l'estudi de recuperació	209
Taula 69. Resultats de la validació interna i dels assajos interlaboratoris.....	212
Taula 70. Comparativa etapes dels mètodes de determinació de crom (VI), no=es realitza, no=no es realitza. *Aquests temps es refereixen a una anàlisi per duplicat i no contempla els apartats 1 i 2, ni el temps invertit en preparar els reactius.	213
Taula 71. Comparativa dels reactius i materials fungibles emprats en la determinació de Cr(VI) pel mètode fotolorimètric i pel cromatogràfic.....	214
Taula 72. Comparativa del material volumètric emprat en l'etapa 3 per a una determinació de Cr (VI) en cada un dels mètodes	215



Índex de figures

Fig. 1. Esquema del procés de producció de colorants azoics	17
Fig. 2. Diagrama de Pourbaix (65)(66).....	30
Fig. 3. Cronologia de les restriccions al Cr (VI) en pell	33
Fig. 4. Principals components d'un sistema cromatogràfic HPLC	38
Fig. 5. Matriu de poliestirè. Font : http://dardel.info/IX/IX_Intro.html	39
Fig. 6. Intercanvi d'anions. Les càrregues positives representen els grups funcionals (llocs iònics fixos).....	39
Fig. 7. Resina intercanviadora catiònica tipus àcid fort(a) i resina intercanviadora aniònica tipus base forta(b).....	41
Fig. 8. Tipus d'exercicis d'intercomparació o assajos interlaboratoris	57
Fig. 9. Exemples de relacions s/n de 3: 1 i de 10: 1, que s'aproximen als requisits per al LD i LQ, respectivament	63
Fig. 10. Representació gràfica dels paràmetres que intervenen en el càlcul de la relació s/n..	64
Fig. 11. Etapes de la recerca per desenvolupar metodologia HPLC aplicable a la determinar anions d'interès en adoberia	68
Fig. 12. Espectre UV registrat d'una solució de nitrat de concentració aproximada 5 mg/L.....	73
Fig. 13. Espectre UV registrat d'una solució d'acetat de concentració aproximada 80 mg/L	73
Fig. 14. Espectre UV d'una dissolució de 20 mg/L de ftalat àcid de potassi	78
Fig. 15. Cromatograma tridimensional de diferents anions amb fase mòbil 2mM biftalat, 6% (v/v) d'acetonitril i pH final 5,0	79
Fig. 16. Cromatograma d'un patró amb anions inorgànics (nitrit, nitrat i sulfat) abans d'invertir la resposta del detector	81
Fig. 17. Cromatograma d'un patró amb anions inorgànics (nitrit, nitrat i sulfat) després d'invertir la resposta del detector.....	81
Fig. 18. Pic fantasma obtingut en la primera injecció d'una sessió de treball realitzant un equilibrat inicial de 15 minuts.....	82
Fig. 19. Cromatograma d'un patró multicomponent de PO_4^{2-} , F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , i amb les condicions de la Taula 11.....	83
Fig 20. Equació del càlcul de plats teòrics EP (farmacopea europea). Font: Opción de software de adecuabilidad del sistema (System Suitability)de Empower, Guía rápida Waters, p.23	84
Fig. 21. Variació del temps de retenció amb la temperatura (fase mòbil hidrogen ftalat potàssic 2m M amb un 8% d'acetonitril i pH 5,2, 260nm)	86
Fig. 22.Representació gràfica de la variació del temps de retenció en funció del percentatge d'acetonitril (fase mòbil 2mM ftalat àcid de potassi a pH 5,0. Temperatura 30°C, 15 µL, 260nm)	88
Fig. 23. Representació gràfica de l'efecte del contingut d'acetonitril de la fase mòbil sobre el nombre de plats teòrics per als analits estudiats amb la fase mòbil 2mM ftalat àcid de potassi , pH 5,0, 0°C i 260 nm.....	89
Fig. 24. Cromatograma obtingut amb la fase mòbil 2mM en ftalat àcid de potassi al 10% acetonitril (v/v) i pH 6,5 a 30°C.....	91

Fig. 25. Influència del pH sobre el temps de retenció (fase mòbil 2 mM en ftalat àcid de potassi 10 % acetonitril)	91
Fig. 26. Càlcul de la resolució entre dos pics cromatogràfics.....	92
Fig. 27. Cromatograma d'un patró que conté fluorur, fosfat, clorur, nitrat, nitrit, bromur i sulfat obtingut amb la fase mòbil 1mM en ftalat àcid de potassi, 8% d'acetonitril i pH 6,18	94
Fig. 28. Efecte de la composició de la fase mòbil en el temps de retenció. Volum d'injecció 15 µL. Concentració aproximada de cada analit: 40 ppm.....	94
Fig. 29. Cromatograma capturat a 250 nm d'una solució patró de 7 anions a 40 mg/L amb l'eluent 2mM en ftalat àcid de potassi.....	96
Fig. 30. Cromatograma capturat a 250 nm d'una solució patró de 7 anions a 40 mg/L amb l'eluent 1mM en ftalat àcid de potassi.....	96
Fig. 31. Cromatograma obtingut amb el patró de 10 ppm de Nitrat (15 µL, 210 nm, 30 °C i fase mòbil borat-gluconat)	106
Fig. 32. Cromatograma obtingut amb el patró de 10 ppm de Nitrit (15 µL, 210 nm, 30 °C i fase mòbil borat-gluconat)	106
Fig. 33. Comparativa de les rectes de calibratge per l'anió nitrat amb les fases mòbils sulfat sòdic i borat gluconat.....	111
Fig. 34. Rectes de calibratge obtingudes per a l'anió formiat a 210 nm a dos valors de pH diferents (8,24 i 6,74).....	113
Fig. 35. Exemple de nomenclatura de mostres	120
Fig. 36. Molí utilitzat en la preparació de les mostres	120
Fig. 37. Esquema extraccions consecutives	123
Fig. 38. Filtre de nylon i vial.....	123
Fig. 39. Cromatograma amb detecció indirecta on s'indica el temps de retenció de cada anió	125
Fig. 40. Cromatograma amb detecció directa on s'indica el temps de retenció de cada anió .	125
Fig. 41. Cromatogrames superposats de dos patrons multianions (un conté fosfat en comptes de formiat). Detecció indirecta	126
Fig. 42. Cromatograma comparatiu extracció ràpida (blau) i lenta (negra). Pell 1. Detecció indirecta	134
Fig. 43. Cromatograma comparatiu extracció ràpida (negra) i lenta (blau). Pell 4. Detecció indirecta	136
Fig. 44. Cromatograma comparatiu extracció ràpida (blau) i lenta (negra.) Pell 6. Detecció indirecta	137
Fig. 45. Cromatograma comparatiu extracció ràpida (negra) i lenta (blau.) Pell 7. (Detecció indirecta)	138
Fig. 46. Espectre IR ATR pell 12	145
Fig. 47. Cromatograma comparatiu (detecció indirecta) de les tres extraccions consecutives pell 12.....	146
Fig. 48. Filtració amb cartutx SPE	159
Fig. 49. Mostra d'un oli i de les dilucions prèvies a l'anàlisi cromatogràfica	160
Fig. 50. Cromatograma d' una mostra de colorant marró per a bombo. Pics: Clorur 4.140 min; Sulfat 15,433 min. (Detecció indirecta).....	163

Fig. 51. Cromatograma d'una mostra d'àcid fòrmic adulterat amb àcid sulfúric.. Pics: Formiat 3.596, Sulfat 16.358 min. (Detecció indirecta).....	163
Fig. 52. Cromatograma d'una mostra d'àcid fòrmic comercial (detecció directa). Pic: Formiat 4,049 min.....	165
Fig. 53. Etapes del desenvolupament de mètode cromatogràfic	174
Fig. 54. Reacció entre la difenilcarbàcida i l'anió cromat.....	175
Fig. 55. Esquema del procediment de determinació de Cr(VI) en pell segons la ISO 17075:2007	176
Fig. 56. Decoloració de l'extracte d'una napa negra mitjançant la tècnica d'extracció en fase sòlida amb cartutx SPE	177
Fig. 57. Extractes de pell abans i després de la filtració SPE (erlenmeyers i matrassos aforats, respectivament) i aspecte dels cartutxos SPE després de la filtració	178
Fig. 58. Vials amb extractes de cuir per ser injectats en el cromatògraf (no es necessària l'extracció amb cartutxos SPE per decolorar)	179
Fig. 59. Evolució cronològica de les normes oficials per a la determinació de crom hexavalent en cuir.....	180
Fig. 60. Temps de retenció del pic del cromat en funció de la concentració de la fase mòbil (8% ACN en tots els casos)	188
Fig. 61. Espectre UV de l' anió cromat dissolt en fase mòbil	190
Fig. 62. Comparativa de cromatogrames de dissolució de 0,05 mg/L Cr(VI) en sulfat amònic 25 mM: blau (372 nm), negre (370). (Vinj 20 µL).....	192
Fig. 63. Comparativa de cromatogrames de dissolució de 0,2 mg/L Cr (VI) en sulfat amònic 25 mM: blau (372 nm), negre (370). (Vinj 20 µL).....	192
Fig. 64. Comparativa de les rectes de calibratge de crom hexavalent a 370 nm i 372 nm. (Volum d'injecció 40 µL, fase mòbil 50 mM en sulfat amònic).....	193
Fig. 65. Cromatograma obtingut d'una mostra de pell que conté 5 mg Cr (VI)/Kg ,segons les condicions de Taula 61.....	197
Fig. 66. Cromatograma obtingut d'una mostra de pell que conté 7,7 mg Cr (VI)/Kg, segons les condicions	197
Fig. 67. Esquema del procediment cromatogràfic per a la determinació de crom hexavalent en pell.....	201
Fig. 68.Comparativa de temps, consumibles i material volumètric requerits pels mètodes colorimètric i cromatogràfic (etapa 3 per duplicat, dos extractes de la mateixa mostra)	216
Fig. 69. Pell marró fosc, l'extracte de la qual no es va poder decolorar	217
Fig. 70. Pell de color vermell, l'extracte de la qual no es va poder decolorar	217

iques.



Glossari / Abreviatures

Absorbància (A): Concepte que indica la quantitat de llum absorbida per una substància.

ACN: Acetonitril.

AOAC: Associació de Químics Analítics Oficials.

Canon d'abocament: Impost de naturalesa ecològica sobre l'ús i la càrrega contaminant abocada pels diferents usuaris de l'aigua.

CD: Detecció conductimètrica.

CEN/TC 289 : Comité Tècnic de Normalització del Cuir.

CI : Cromatografia iònica.

CSIC: Consell Superior d'Investigacions Científiques.

Còdex Alimentarius: Col·lecció reconeguda internacionalment de normes, codis de pràctiques, guies i altres recomanacions relatives als aliments, la seva producció i la seguretat alimentària amb l'objectiu de protegir el consumidor.

COV's: Compostos orgànics volàtils

EDAR: Estació depuradora d'aigües residuals.

Efluent: 1. La fase mòbil que abandona la columna. 2. Tot residu gasós, líquid o sòlid, o barreja d'ells que flueix a un cos receptor.

Eluent: Fase mòbil.

EURACHEM: Xarxa d'organitzacions d'Europa, que té com a objectius establir un sistema de traçabilitat internacional dels mesures químiques i promoure les bones pràctiques de qualitat.

FIA: Anàlisi per injecció de flux.

FID: Detector d'ionització de flama

HPLC: Cromatografia líquida d'alta resolució.

ICP-OES: Plasma d'acoblament inductiu-espectrometria d'emissió òptica.

IR-ATR: Espectrofotometria Infraroja-Reflectància Total Atenuada.

ISO/FDIS: International Organization for Standardization / Final Draft International Standard.

IULTCS: International Union of Leather Technologists and Chemists Societies.

IUPAC: Unió Internacional de Química Pura i Aplicada.

Línia de base: És la part del registre cromatogràfic que correspon a la fase mòbil pura.

Loop: Vàlvula injectora del cromatògraf.

MTD (Millor tecnologia disponible): Els processos més avançats en el desenvolupament d'una activitat que indiquen la idoneïtat pràctica d'una mesura específica per limitar les descàrregues, les emissions i els rebuigs al medi ambient.

OMS: Organització Mundial de la Salut.

PDA : Fotodíodes array. Tipus de detector UV-VIS que permet obtenir cromatogrames tridimensionals.

Pic fantasma: Pic d'origen desconegut, o inexplicable, dins d'un cromatograma i que no pertany a cap analit.

Rang: Interval entre la concentració inferior i superior per les quals s'ha demostrat la linealitat del mètode o qualsevol altre paràmetre.

Ribera (operacions de ribera): Aquells processos d'adoberia que es realitzen en humit.

Robustesa: Capacitat d'un mètode analític per romandre inalterat front petites però deliberades variacions en certs paràmetres, proporcionant idea de la seva fiabilitat o estabilitat durant el seu ús rutinari.

SPE: Extracció en fase sòlida.

TCMTB: Fungicida emprat en curtits (2-(tiocianometiltio)benzotiazol).

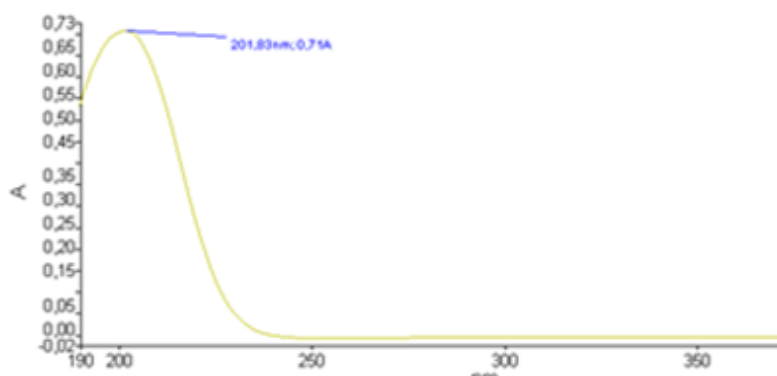
UV-VIS: Ultraviolat-Visible.

Annex 1.

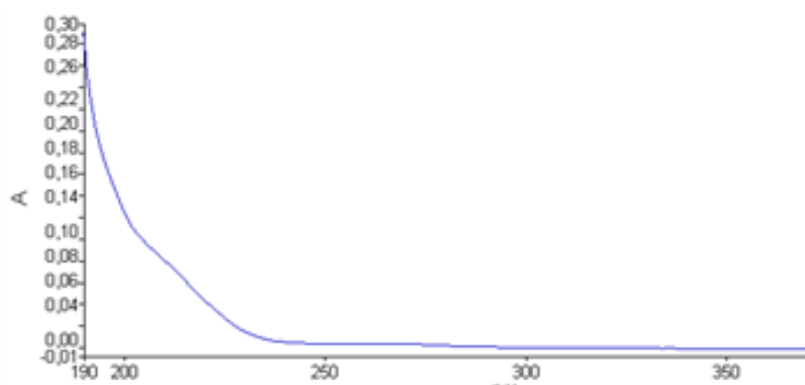
Espectres UV d'anions d'interès



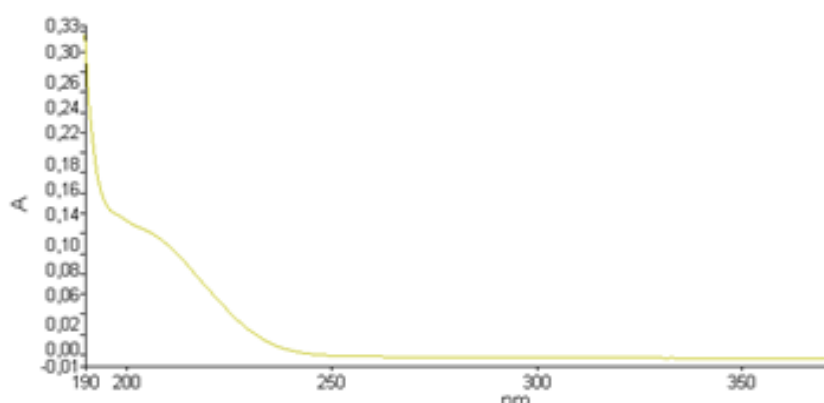
El dissolvent emprat en les dissolucions ha estat aigua UP. Els espectres dels anions nitrat i acetat es troben a l'apartat 5.3.



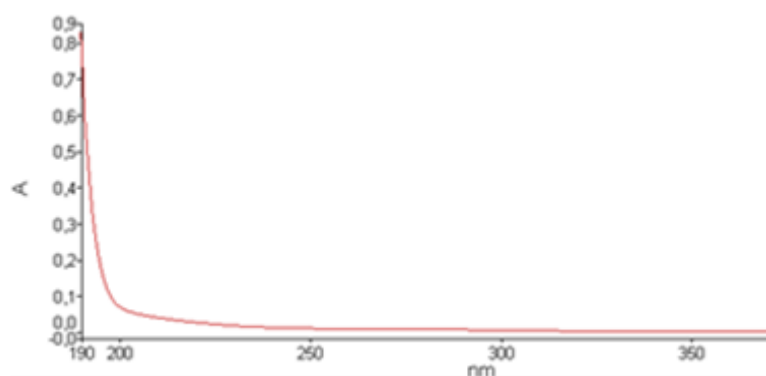
Espectre UV registrat d'una solució de **nitrat** de concentració aproximada 5ppm



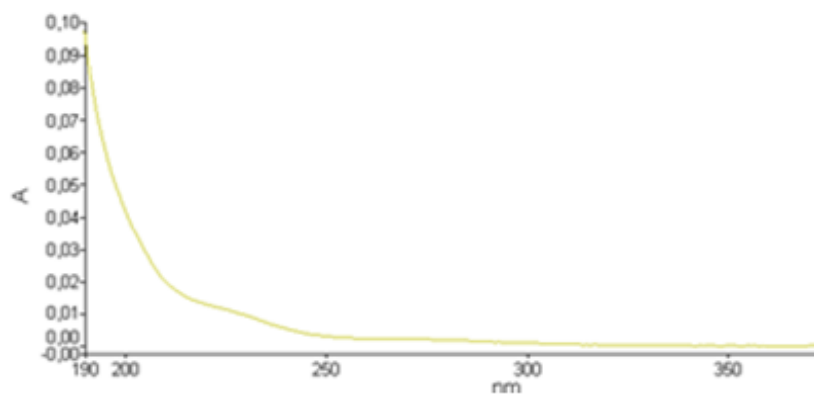
Espectre UV registrat d'una solució d'**acetat** de concentració aproximada 80ppm



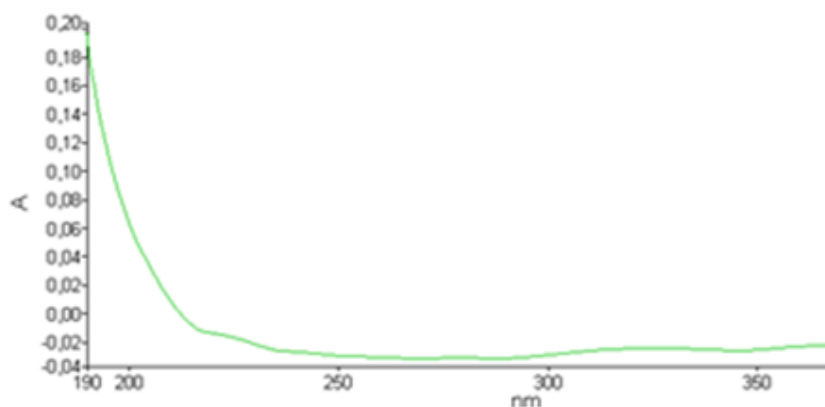
Espectre UV registrat d'una solució de **formiat**, de concentració aproximada 80ppm



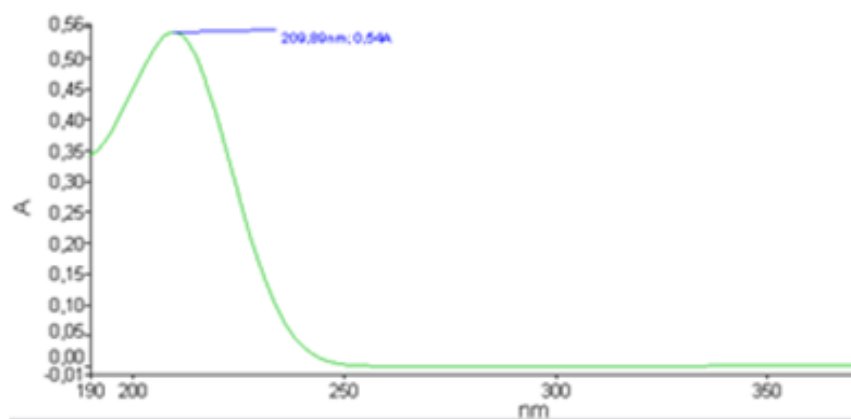
Espectre UV registrat d'una solució de **clorur** de concentració aproximada 40 ppm



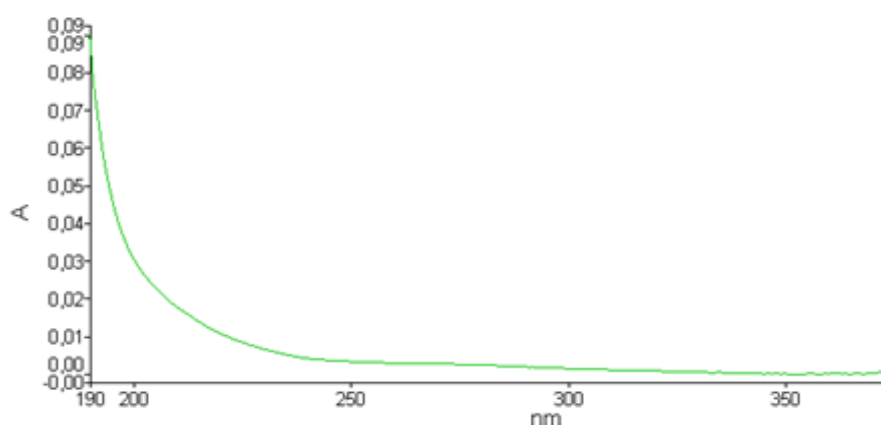
Espectre UV registrat d'un solució de **sulfat** concentració aproximada 50 ppm sulfat



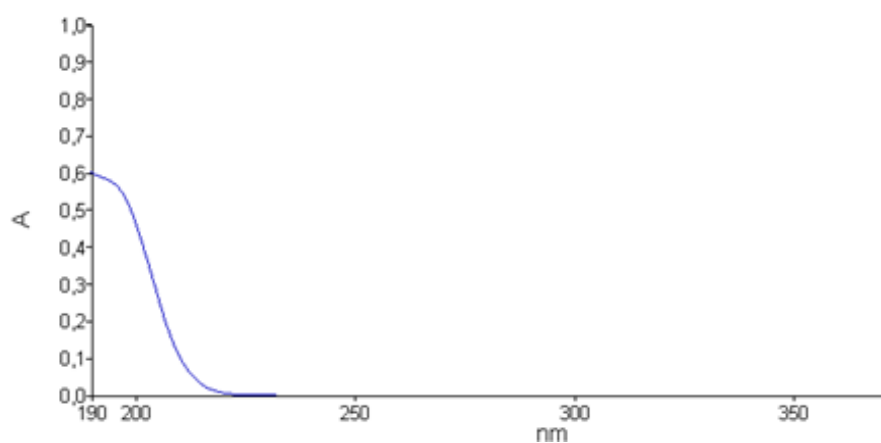
Espectre UV registrat d'una solució de **fosfat** de concentració aproximada 80 ppm fosfat



Espectre UV registrat d'una solució de **nitrit** de concentració aproximada 5 ppm



Espectre UV registrat d'una solució de **fluorur** de concentració aproximada 40 ppm



Espectre UV registrat d'una solució de **bromur** de concentració aproximada 8 ppm



Annex 2.

Resultats de l'estudi de robustesa

(sulfat sòdic com a eluent)



Resultats de l'estudi de la robustesa per als diferents analits (disseny factorial 2² realitzat amb el programa StathGraphics)

En tots els casos:

- S'aplica un disseny factorial amb dos factors (pH i longitud d'ona) i a dos nivells cada factor.
- El valors -1 correspon al nivell inferior i el 1 al nivell superior.
- Les longituds d'ona estudiades són 202 i 210 nm.
- Els valors de pH assajats són 6,74, 8,24.
- La sensibilitat del calibratge (resposta) és la pendent de la recta de calibratge obtinguda amb 5 patrons de cada analit en l'interval de concentracions de 0,5 a 26 mg/L.
- La fase mòbil emprada és sulfat sòdic 1mM 8 % ACN (pH variable).
- Es determina, amb un nivell de confiança de 95 %, que el pH no afecta significativament la sensibilitat del calibratge en els analits estudiats (p-value superior a 0,05).

Anió formiat

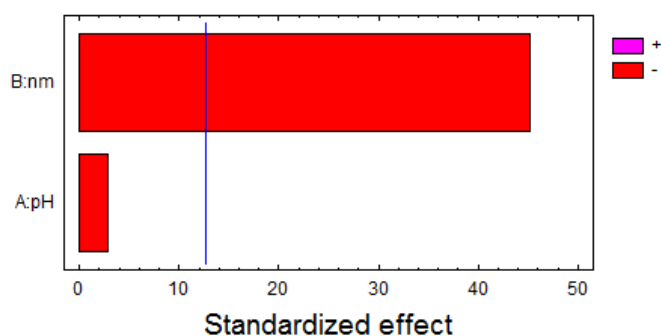
pH: 6,74, 8,24

pH	nm	sensibilitat
-1,0	-1,0	2160,4
1,0	-1,0	2096,6
-1,0	1,0	1384,3
1,0	1,0	1354,1

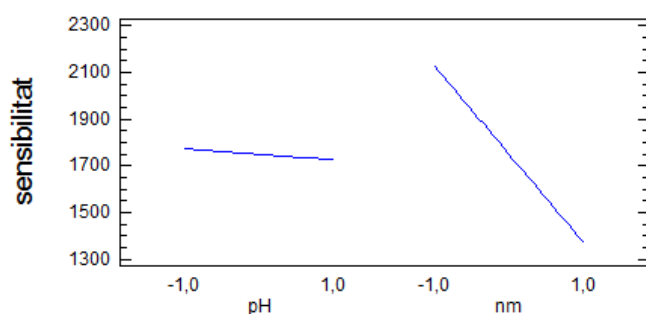
Analysis of Variance for sensibilitat					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:pH	2209,0	1	2209,0	7,83	0,2185
B:nm	576536,0	1	576536,0	2042,72	0,0141
Total error	282,24	1	282,24		
Total (corr.)	579028,0	3			

R-squared = 99,9513 percent
 R-squared (adjusted for d.f.) = 99,8538 percent
 Standard Error of Est. = 16,8
 Mean absolute error = 8,4
 Durbin-Watson statistic = 2,0
 Lag 1 residual autocorrelation = -0,25

Standardized Pareto Chart for sensibilitat



Main Effects Plot for sensibilitat



Anió Nitrit

pH: 6,74, 8,24

pH	nm	sensibilitat
-1,0	-1,0	98254
1,0	-1,0	87606
-1,0	1,0	110289
1,0	1,0	109062

Analysis of Variance for sensibilitat

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:pH	3,52539E7	1	3,52539E7	1,59	0,4270
B:nm	2,80412E8	1	2,80412E8	12,64	0,1746
Total error	2,21888E7	1	2,21888E7		
Total (corr.)	3,37854E8	3			

R-squared = 93,4324 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 80,2973 percent

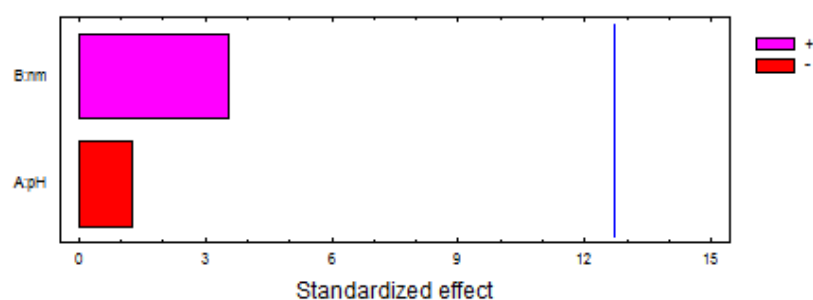
Standard Error of Est. = 4710,5

Mean absolute error = 2355,25

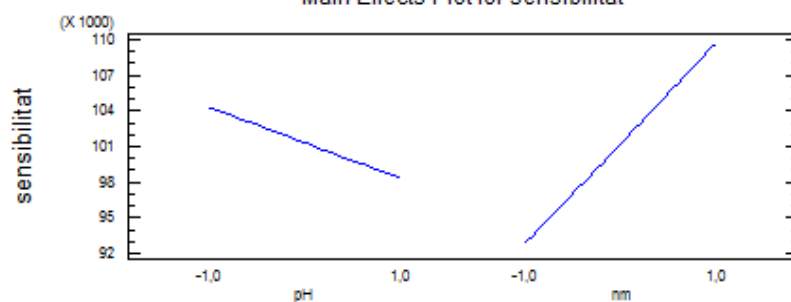
Durbin-Watson statistic = 2,0

Lag 1 residual autocorrelation = -0,25

Standardized Pareto Chart for sensibilitat



Main Effects Plot for sensibilitat

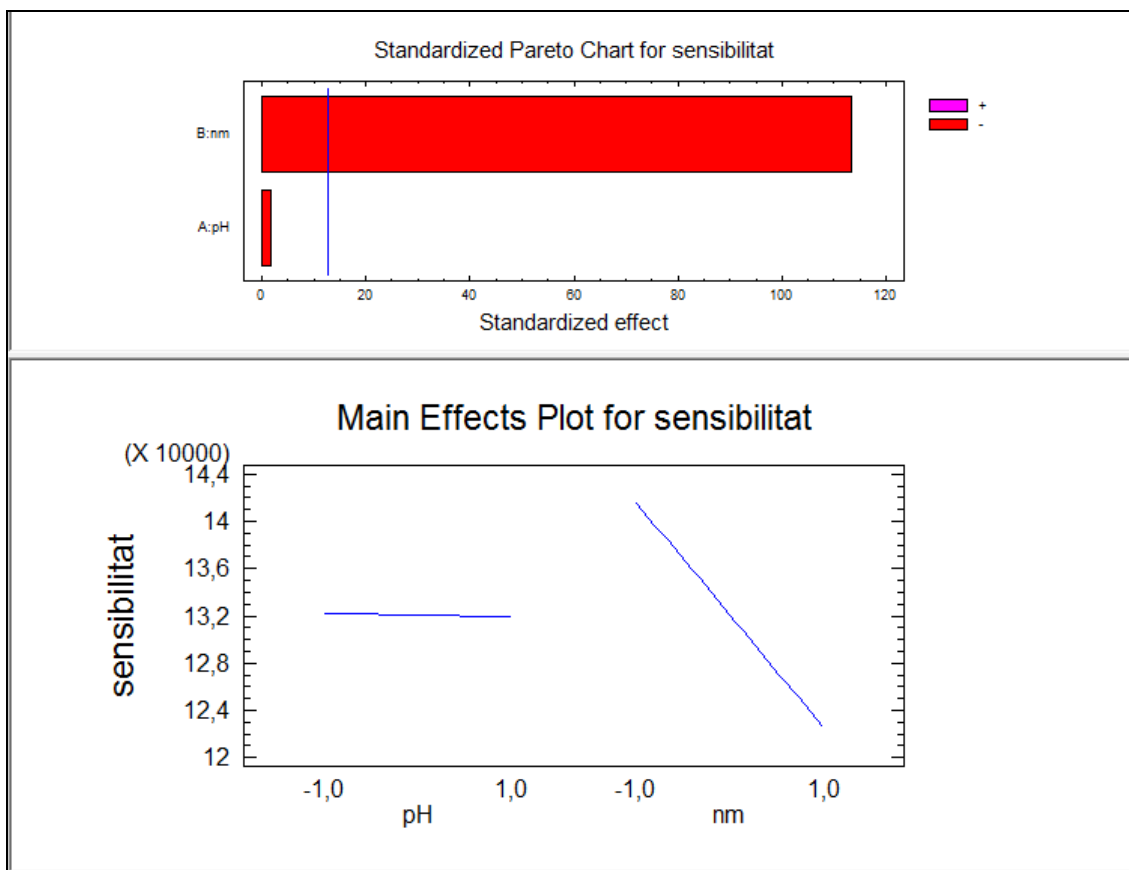


Anió Nitrat

pH: 6,74, 8,24

	202 nm	210 nm
pH 6'57	141642	122763
Ph 8'24	141532	122317

Analysis of Variance for sensibilitat					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:pH	77284,0	1	77284,0	2,74	0,3461
B:nm	3,62788E8	1	3,62788E8	12853,89	0,0056
Total error	28224,0	1	28224,0		
Total (corr.)	3,62894E8	3			
R-squared = 99,9922 percent					
R-squared (adjusted for d.f.) = 99,9767 percent					
Standard Error of Est. = 168,0					
Mean absolute error = 84,0					
Durbin-Watson statistic = 2,0					
Lag 1 residual autocorrelation = -0,25					



Anió Acetat

pH: 6,74, 8,24

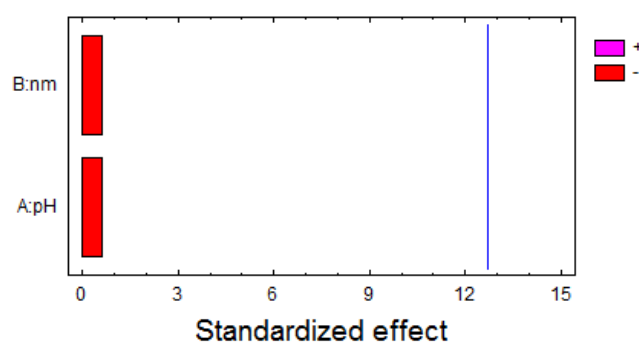
	202 nm	210 nm
pH 6'82	813'68	836'29
Ph 8'24	836'39	812'34

Analysis of Variance for sensibilitat

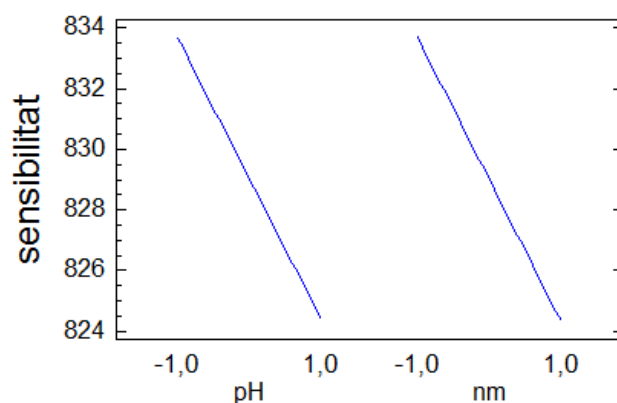
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:pH	86,1184	1	86,1184	0,40	0,6409
B:nm	87,9844	1	87,9844	0,41	0,6378
Total error	215,209	1	215,209		
Total (corr.)	389,312	3			

R-squared = 44,7207 percent
 R-squared (adjusted for d.f.) = 0,0 percent
 Standard Error of Est. = 14,67
 Mean absolute error = 7,335
 Durbin-Watson statistic = 2,0
 Lag 1 residual autocorrelation = -0,25

Standardized Pareto Chart for sensibilitat



Main Effects Plot for sensibilitat



Annex 3.

PNT Determinació de

fosfat per fotocolorimetria



 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT AGr007: DETERMINACIÓ DEL FÒSFOR TOTAL EN AIGÜES RESIDUALS PER ESPECTROMETRIA DE MOLIBDÈ D'AMONI			
	Substrat: Aigua	Data redacció: des-2006 Última revisió: gener-2016	Edició: v1.1	Núm. pàgines: 8

1. Aplicació

Rang en que la tècnica és útil: 0,04-0,4 ppm (recta de calibrat).

Tipus de matriu: aigües residuals.

Temps d'anàlisi: 3h.

Interferències:

- Silicat: concentracions de silicat de fins a 5 mg Si/L no interfereixen. Tot i així en concentracions més elevades pot produir un increment en la absorbància.
- Arsenat: l'arsenat provoca una coloració similar a la produïda per el ortofosfat. Aquesta interferència pot eliminar-se per reducció de l'arsenat a *arsenit* amb tiosulfat de sodi 12 g/L.
- Sulfur d'hidrogen: és tolerable en concentracions de fluorur de fins a 70 mg/L. Concentracions superiors a 200 mg/L inhibeixen totalment el desenvolupament del color.
- Metalls de transició:
El ferro influeix en la intensitat del color, però l'efecte d'una concentració de 10 mg Fe/L té una incidència inferior al 5%. L'increment en la coloració provocat pel vanadat és lineal i té un valor aproximat d'un 5% per una concentració de 10 mg V/L.
El crom (III) i el crom (VI), en concentracions de fins a 10 mg/L no interfereixen, però una concentració d'aproximadament 50 mg/L de Cr augmenta l'absorbància en un valor pròxim al 5%.
El coure en concentracions de fins a 10 mg/L no interfereix.
- Aigua de mar: les variacions de la salinitat tenen una influència menyspreable en la intensitat del color.
- Nitrit: si la concentració de nitrit supera els 3,29 mg/L pot produir-se una decoloració. Un lleuger excés d'àcid sulfàmic descompon eficaçment els nitrits; 100 mg d'àcid són suficients per tractar una concentració de nitrits de 32,9 mg/L.

Restriccions: no aplica.

2. Principi

Reacció dels ions ortofosfats amb una solució àcida que conté ions de molibdat i antimoni per formar un complex antimonil-fosfomolibdat.

Reducció del complex amb àcid ascòrbic per formar un complex blau de molibdè, intensament colorejat.

Mesura de la absorbància d'aquest complex per determinar la concentració d'ortofosfat present a 880nm.

Els polifosfats i certs compostos organofosforats es determinen si es transformen, per hidròlisi amb àcid sulfúric, en ortofosfats que reaccionen amb el molibdat.

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A3 UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT AGr007: DETERMINACIÓ DEL FÒSFOR TOTAL EN AIGÜES RESIDUALS PER ESPECTROMETRIA DE MOLIBDÈ D'AMONI			
	Substrat: Aigua	Data redacció: des-2006 Última revisió: gener-2016	Edició: v1.1	Núm. pàgines: 8

Molts compostos organofosforats es transformen en ortofosfats per mineralització amb peroxodisulfat.

Quan és precís un tractament més energètic, s'utilitza la mineralització amb mescla d'àcids nítric i sulfúric.

3. Reactius

Els reactius utilitzats són de qualitat analítica reconeguda.

Nom	Fórmula	Riquesa	Qualitat
Àcid ascòrbic	$C_6H_8O_6$	99%	PA
Àcid nítric	HNO_3	65%	Reagent
Àcid sulfúric	H_2SO_4	95-97%	Reagent
Aigua ultrapura	H_2O		Milli-Q RG
Carbonat de sodi <i>anhidro</i>	Na_2CO_3	99%	PA
Dihidrògenfosfat de potàsi anhidro	KH_2PO_4	99,5-100,5%	PA
Heptamolibdat amònic <i>tetrahidrato</i>	$H_{24}Mo_7N_6O_{24} \cdot 4 H_2O$	99%	PA
Hidroxid de sodi	$NaOH$	99%	PA
Nitrogen pur	N_2		50
Paper en tires d'acetat de plom (II)	$Pb(CH_3COO)$		
Tartrat d'antimoni i potassi	$K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 1/2H_2O$	99%	PRS
Sabó sense fosfats (Derquim) LM03		20%	

3.1. Preparació de les solucions auxiliars

3.1.1. Solució de H_2SO_4 9M (Sol. A)

S'introdueixen 400mL d'aigua ultrapura en un vas de precipitats d'1L. S'hi afegeixen, amb molt de cura i amb continua agitació i refrigeració (dins de la campana extractora) 400mL d'àcid sulfúric conc. 98% PA amb proveta. Es mescla bé i es deix refredar la solució a temperatura ambient. **(Reacció molt exotèrmica).**

3.1.2. Solució d'àcid ascòrbic 100g/L. (Sol. D)

Es dissolen 5 g d'àcid ascòrbic en 50mL d'aigua ultrapura en un vas de precipitats. S'agita fins el total de la dissolució. La solució és estable durant 2 setmanes si es conserva a la nevera, en un recipient de vidre de color topazi, i pot utilitzar-se mentre es mantingui incolora.

3.1.3. Solució de molibdat àcid. (Sol. E)

S'afegeixen amb molt de cura 115mL amb proveta d'àcid sulfúric 9M (Sol. A) a 35mL amb proveta d'aigua ultrapura i es deix refredar.

Es dissolen 65g d'heptamolibdat amònic tetrahidrat en 50mL d'aigua ultrapura. S'afegeix la solució d'àcid i es mescla bé.

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT AGr007: DETERMINACIÓ DEL FÒSFOR TOTAL EN AIGÜES RESIDUALS PER ESPECTROMETRIA DE MOLIBDÈ D'AMONI			
	Substrat: Aigua	Data redacció: des-2006 Última revisió: gener-2016	Edició: v1.1	Núm. pàgines: 8

Es dissolen 0,175g de tartrat d'antimoni i potassi hemihidrat en 50mL d'aigua ultrapura. S'afegeix a la solució de molibdat àcid i es mescla bé.

Reactiu estable durant al menys 2 mesos si es conserva en una botella de vidre de color topazi.

3.1.4. Solució de NaOH 8M (Sol. F)

Es pesen 160g de NaOH i es dilueix a 200mL amb aigua prèviament bullida (evita la carbonatació) en un vas de precipitats de 1000mL. NOTA: Solució molt exotèrmica; s'ha de realitzar a la campana extractora. Deixar refredar la dissolució en el vas de precipitats fins a temperatura ambient. Finalment s'afegeix aigua ultrapura fins a 500mL.

La solució es conserva en un recipient de polietilè.

3.1.5. Solució patró mare d'ortofosfat, 50ppm (Sol. G)

Es pesen 0,2197g de KH_2PO_4 anhidre (assecat a 105°C a l'estufa fins a pes constant) i es dilueixen en 800mL d'aigua ultrapura en un matràs aforat de 1000mL. S'afegeixen 10mL de H_2SO_4 4,5M i s'enrasa amb H_2O ultrapura.

Solució estable durant 3 mesos si es conserva en un recipient de vidre ben tapat i a la nevera.

3.1.6. Solució patró ortofosfat, 2ppm P (Sol. H)

Es pipetegen 10mL de la solució G i s'enrasen en un matràs aforat (250mL) amb aigua ultrapura.

Aquesta solució es prepara cada cop que s'utilitza.

4. Material

- 4.1. Cubetes de plàstic (Plastibrand).
- 4.2. Embuts de forma alemanya petits i grans.
- 4.3. Matrassos aforats de 25, 50, 100, 250, 500, 1000 mL.
- 4.4. Micropipeta 1,5mL.
- 4.5. Pipetes aforades 5, 10, 15, 20, 25, 50 mL.
- 4.6. Pipetes Pasteur.
- 4.7. Provets 50, 100, 250, 500 mL.
- 4.8. Matrassos Kjeldahl de digestió.
- 4.9. Vaso de precipitats 50, 100, 250, 500, 100 mL.

5. Aparells

- 5.1. Balança analítica de precisió (Cobos).
- 5.2. Balança granatari (Cobos).
- 5.3. Bloc digest 12 (Selecta).
- 5.4. Estufa Digitronic (Selecta).
- 5.5. Espectrofotòmetre UV-VIS (Unicam, UV2-100).
- 5.6. Sistema de purificació d'aigua (Millipore).

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT AGr007: DETERMINACIÓ DEL FÒSFOR TOTAL EN AIGÜES RESIDUALS PER ESPECTROMETRIA DE MOLIBDÈ D'AMONI			
	Substrat: Aigua	Data redacció: des-2006 Última revisió: gener-2016	Edició: v1.1	Núm. pàgines: 8

6. Registre de dades primàries

- N° d'anàlisi
- Volum de mostra pipetejada i també la numeració corresponent del tub Kjeldahl de digestió.
- Volum d'enrasament de la mostra
- Factor de dilució necessari per obtenir una senyal de rang de treball.
- Valors d'absorbància i concentració (mg/L) obtinguts per cada duplicat (mostra i blanc de mostra en cas de ser necessari el seu desenvolupament).
- Els valors d'absorbància i concentració per el blanc de digestió.
- La concentració de fòsfor a la mostra s'expressa en mg P/L o mg PO₄³⁻/L.

7. Mesures de seguretat

Es segueixen les indicacions especificades en el PGL004 Seguretat de treball al laboratori.

8. Procediment

Determinació del fòsfor total després de l'oxidació amb àcid nítric - àcid sulfúric (part 8 de la Norma UNE EN ISO 6878)

8.1. Corba de calibratge

Per l'elaboració de la recta de calibrat es procedeix tal i com s'especifica en l'apartat 7.3 des de: "s'afegeixen 2mL d'àcid sulfúric conc.". Es procedeix de la mateixa manera pels patrons que per les mostres.

Es preparen dos solucions mare de fòsfor G1 i G2 (50 ppm P) i les seves dos solucions filles corresponents H1 i H2 (2 ppm P), per preparar de forma intercalada cada un dels patrons de la recta, tal i com s'indica la taula.

Es transfereixen per mitjà d'una micropipeta o pipeta aforada els volums apropiats de solució patró de fòsfor als matrassos Kjeldahl de digestió; aquestes solucions presenten concentracions de fòsfor entre 0,04mg/L i 0,4 mg/L. El volum afegit als matrassos Kjeldahl de patró serà el que s'indiquin en la taula següent:

Nº Matràs	I	II	III	IV	V	VI
Solució H1 (mL) 2 ppm P	0	2	-	10	-	20
Solució H2 (mL) 2 ppm P	0	-	5	-	15	-
Digestió àcida, posterior neutralització (en el matràs Kjeldahl) Seguidament es traspasa la solució a un matràs aforat de 100mL, i es procedeix al desenvolupament de color						
Àc. Ascòrbic (Sol. D) (mL)	2	2	2	2	2	2
Esperar 30'' i agitar						
Molibdat àcid, (Sol. E) (mL)	4	4	4	4	4	4
Enrasar amb aigua ultrapura a (mL)	100	100	100	100	100	100
Concentració (mg P/L)	0 ⁽¹⁾	0,04	0,1	0,2	0,3	0,4

⁽¹⁾Aquesta solució correspon al blanc de digestió

S'esperen uns 15 minuts per procedir amb la lectura. Es realitza la corba de calibratge en l'espectrofotòmetre, escollint l'opció del menú principal *CUANTI*. Les lectura d'absorbància s'efectua a $\lambda=880\text{nm}$, utilitzant aigua ultrapura per la cubeta de referència (veure PIT espectrofotòmetre UV-VIS).

8.2. Preparació de la mostra i emmagatzematge o conservació

Les mostres es recullen en recipients de polietilè o preferentment en recipients de vidre (rentats amb solució Derquim LM03 al 20% o bé un bany d' HNO_3 al 10%). Es sol utilitzar l'envàs de vidre, degut als baixos continguts en fòsfor.

S'afegeixen 0,5mL d'àcid sulfúric 9M per cada 100 mL de mostra sense filtrar. És convenient que la mostra acidificada tingui un pH aproximat d'1 (paper indicador de pH). Es conserva a la nevera fins el seu anàlisi i en la foscor.

La concentració a la mostra de possibles interferències s'ha de comprovar sempre que sigui necessari. La presència de sulfur es pot detectar per el seu olor i després trobar la seva concentració. La presència de crom també es pot detectar per la coloració blau-verdosa, si és necessari es determina el crom per absorció atòmica.

8.3. Descripció del procediment

Es pipetegen 25mL de la mostra acidificada, i s'introdueix al tub Kjeldahl de digestió.

Seguidament, s'afegeixen entre 1 i 2 mL de H_2SO_4 95-98% PA al tub Kjeldahl (en funció de la matèria orgànica present a la mostra, aquesta adició pot ser superior). S'agita i s'escalfa (170°C durant 30 min. en el digestor Selecta), sense col·locar les campanes de buit fins l'aparició de fums blancs. Aquest procés és realitza dins de la campana extractora.

Quan el volum de la mostra ha disminuït, es deix refredar la solució uns minuts, i s'afegeixen amb precaució 10mL d' HNO_3 conc. Es continua la digestió de la mostra (temp. màx. 250°C durant 20-30 min. en el digestor Selecta) col·locant les campanes de buit.

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A3 UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT AGr007: DETERMINACIÓ DEL FÒSFOR TOTAL EN AIGÜES RESIDUALS PER ESPECTROMETRIA DE MOLIBDÈ D'AMONI			
	Substrat: Aigua	Data redacció: des-2006 Última revisió: gener-2016	Edició: v1.1	Núm. pàgines: 8

NOTA: Quan la mostra contingui matèria orgànica abundant, el temps de digestió es pot veure incrementat degut a la adició superior d'àcid nítric. Aquest s'afegeix fins que ja no apareixen fums nitrosos (color marró) i que la solució de digestió quedi incolora-transparent.

Es retiren els tubs del digestor i es deixen refredar dins de la campana extractora.

Es retira la campana extractora de fums.

S'afegeixen uns 10mL d'aigua ultrapura amb el flascó per les parets del tub.

Es deixa refredar.

Després de refredar, es transfereix la solució a un matràs aforat de 50mL. Per assegurar uns transvasament quantitatiu, s'aclareix el matràs de digestió amb petits volums d'aigua ultrapura, que s'afegeixen al matràs aforat.

S'enrasa el matràs aforat amb aigua ultrapura.

Assaig en blanc (blanc de digestió): es realitza paral·lelament a la determinació, un assaig en blanc seguint el mateix procediment operatiu que hem utilitzat per la mostra, fent servir les mateixes quantitats de reactius, però substituint el volum de la mostra per aigua ultrapura.

Desenvolupament del color

Assaig qualitatiu:

Es realitza un assaig qualitatiu de les mostres per estimar el seu contingut en fòsfor. Aquest anàlisi es realitza tal i com s'indica a la següent taula d'adició de reactius, però fent servir un vas de precipitats en substitució de material aforat. Abans de l'adició de reactius que desenvolupen color, s'ha d'ajustar el pH de la solució de digestió entre 3 i 10; per això s'afegeix una gota de fenoltaleïna a la solució de digestió, afegint NaOH 8M gota a gota (Sol. F) fins el color rosat (pH=8-9) i després s'afegeix àcid sulfúric 9M (Sol. A) gota a gota fins la desaparició d'aquesta coloració.

Assaig quantitatiu: Un cop coneguda la dilució necessària, es procedeix al desenvolupament del color:

	Blanc de digestió	Blanc de	Mostra
Solució de digestió	5	5	5
Ajust de pH entre 3-10 (tal i com s'ha descrit anteriorment)			
Àc. Ascòrbic (Sol. D) (mL)	0,5	0	0,5
Esperar 30'' i agitar			
Molibdat àcid, (Sol. E) (mL)	1	1	1
Agitar			
Enrasar a (mL)	25	25	25

⁽¹⁾S'omet la seva preparació en cas que la solució de digestió no presenti coloració.

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A3 UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT AGr007: DETERMINACIÓ DEL FÒSFOR TOTAL EN AIGÜES RESIDUALS PER ESPECTROMETRIA DE MOLIBDÈ D'AMONI			
	Substrat: Aigua	Data redacció: des-2006 Última revisió: gener-2016	Edició: v1.1	Núm. pàgines: 8

NOTA: En cas que la mostra tingui una concentració de fòsfor molt alta farem una dilució intermèdia; si per el contrari, la concentració de fòsfor es molt baixa, utilitzarem 10mL de mostra per desenvolupar color. Mantenir les proporcions de reactius en cas de treballar amb matrassos de diferents volums.

Esperar uns 15 minuts fins el total desenvolupament del color.

S'encén l'espectrofotòmetre UV-VIS, i es carrega la recta corresponent al fòsfor, de l'any en curs, de la biblioteca de l'aparell (veure PIT de l'espectrofotòmetre UV-VIS). El zero base es realitza amb aigua ultrapura. La lectura de les mostres es realitza enfront d'aigua ultrapura.

NOTA:

Els tubs de digestió es renten amb el detergent Derquim LM03 sense fosfats (20%), i s'esbandeixen amb aigua ultrapura. Hi ha una escombreta especial per la seva neteja (dins de l'armari de pica laboratori a prop de les campanes). Tot el material volumètric utilitzat, matrassos aforats, vasos de precipitats, pipetes, s'han de rentar amb àcid nítric 10% (PNG06 limpieza v1.2).

8.4. Control de qualitat

Control de qualitat (patró de 0,2 ppm P)

Es pipetegen 25mL de la solució H (2 ppm P) i es digereix seguint el procediment operatiu de mostra. S'enrasa la solució a 50mL. Procedir d'acord amb la taula anterior per desenvolupar el color.

S'ha d'obtenir un valor comprès entre 0,18 i 0,22 mg P/L. Si això no passa s'ha de repetir la prova. Si no s'aconsegueixen les toleràncies establertes, s'ha de realitzar una acció correctora investigant les causes i proposant mesures correctores. Es realitza cada quadrimestre.

9. Càlculs

El càlcul de concentració final de P s'expressa de la següent forma:

A cada duplicat de mostra se li ha de restar la concentració del blanc de digestió (i la concentració del blanc de mostra si es requereix), fins a obtenir un valor de concentració que es multiplicarà per els factors de dilució realitzats, inclòs el volum inicial i l'enrasament de la mostra:

$$\begin{aligned}
 & \text{Fòsfor total} \left(\text{mg} \frac{\text{P}}{\text{L}} \right) \\
 &= (C_{\text{mostra}} - C_{\text{blanc}} - C_{\text{blanc mostra}}) \times \frac{25}{V_{\text{mostra digerida}}}^{(1)} \times \frac{50}{V_{\text{mostra}}} \times \text{Dil.}
 \end{aligned}$$

⁽¹⁾Aquesta dilució pot variar segons la quantitat de fòsfor esperat.

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A3 UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT AGr007: DETERMINACIÓ DEL FÒSFOR TOTAL EN AIGÜES RESIDUALS PER ESPECTROMETRIA DE MOLIBDÈ D'AMONI			
	Substrat: Aigua	Data redacció: des-2006 Última revisió: gener-2016	Edició: v1.1	Núm. pàgines: 8

On:

C_{mostra} = concentració mesurada de mostra per l'instrument.

C_{blanc} = concentració mesurada del blanc de digestió per l'instrument.

$C_{\text{blanc mostra}}$ = concentració mesurada del blanc de mostra per l'instrument.

$V_{\text{mostra digerida}}$ = volum de mostra digerida per desenvolupar el color.

V_{mostra} = volum de mostra pipetejat per la digestió.

Dil. = possibles dilucions necessàries segons el contingut de fòsfor.

Per el càlcul del resultat de fòsfor total expressat com fosfat:

$$\begin{aligned}
 \text{Fosfat} \left(\frac{\text{mg PO}_4^{3-}}{\text{L}} \right) &= \frac{\text{mg P}}{1\text{L}} \times \frac{1\text{g P}}{1000\text{mg P}} \times \frac{1\text{mol P}}{30,9738\text{g P}} \times \frac{1\text{mol PO}_4^{3-}}{1\text{mol P}} \times \frac{94,9714\text{g PO}_4^{3-}}{1\text{mol PO}_4^{3-}} \times \frac{1000\text{mg PO}_4^{3-}}{1\text{g PO}_4^{3-}}
 \end{aligned}$$

És a dir,

$$\text{Fosfat} \left(\frac{\text{mg PO}_4^{3-}}{\text{L}} \right) = \text{mg P} \frac{\text{P}}{\text{L}} \times 3,0662$$

El resultat final de l'anàlisi es dona en mg P/L o mg PO_4^{3-} /L i ha de ser el valor mig de com a mínim de 2 determinacions; expressat en una xifra decimal, i ha de ser el valor mig de com a mínim 2 determinacions; expressat amb una xifra decimal per valors inferiors a 100 ppm i sense decimal per valors superiors.

La incertesa es calcula a partir de les dades primàries associades a la determinació.

Límit de detecció: <0,2 ppm

10. Aspecte ambiental

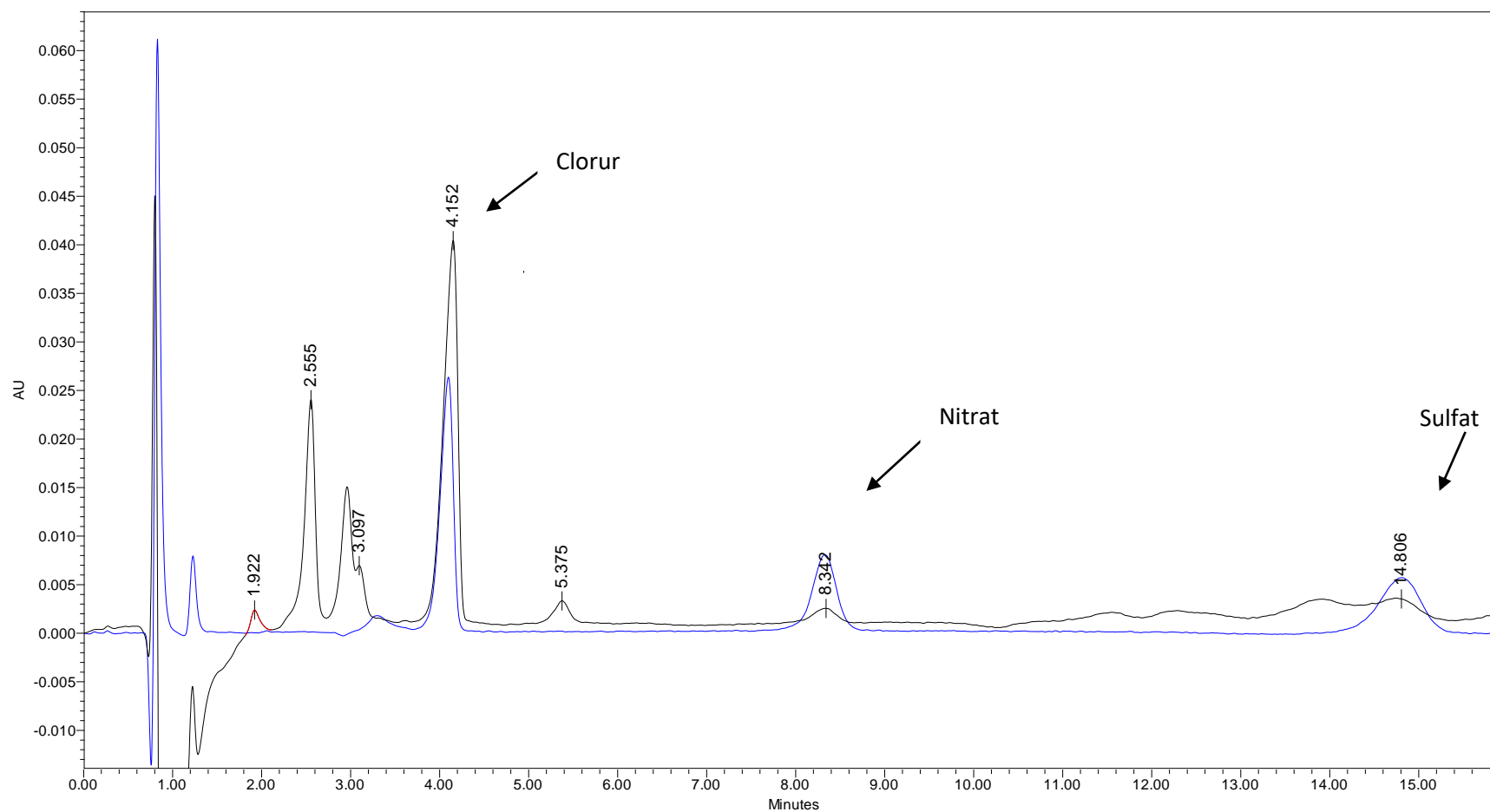
Es segueixen les indicacions especificades en el PGL005 Aspecte ambiental.

11. Bibliografía

Norma UNE EN ISO 6878:2005. Calidad del agua. Determinación del fósforo. Método espectrométrico de molibdato de amonio. (ISO 6878:2004)

Annex 4.
Cromatograma
d'una pell de mamut





Cromatogrames obtinguts de l'extracte de pell de mamut (negre) i d'un patró multicomponent (blau). Detecció indirecta.



Annex 5.

Manteniment, regeneració i conservació

de la columna cromatogràfica



MANTENIMIENTO DE LA COLUMNA IC-Pack Anion HR

-LIMITACIONES DE LA COLUMNA IC-Pack Anion HR:

- No utilizar ni metanol, ni tetrahidrofurano.
- La concentración de otros solventes orgánicos no debe exceder el 12%.
- No superar un 12% de ACN.
- No superar concentraciones de sales de 0.1 M.
- Si se trabaja a pH superiores a 9, utilizar un absorbente de dióxido de carbono.
- No exceder un flujo de 1.0 mL/min.

-REGENERACIÓN DE LA COLUMNA IÓNICA IC-Pack Anion HR

Preparación de reactivos:

-EDTA 10mM (pH 7)

- Pesar 3.7 g de EDTA disódico dihidrato, disolver en agua UP, trasvasar a un matraz aforado de 1L y enrasar con UP.
- Ajustar el pH a 7 (con NaOH o LiOH 0.1M).
- Filtrar con filtro de 45 μm (Millipore HAWP04700)

-HNO₃ 100 mM

- Pipetear 3.4 mL de ácido nítrico (al 65% y densidad 1.41 g/mL) y transferir a un matraz aforado de 0.5 L que contenga un poco de agua UP.
- Enrasar con agua UP.
- Filtrar con filtro de 45 μm (Millipore HAWP04700).

Proceso de regeneración:

- Colocar la columna iónica de forma que no esté conectada al detector, tal y como muestran las siguientes imágenes (Fig. 1 y Fig. 2):



Fig. 1. Conexión de la columna durante la regeneración

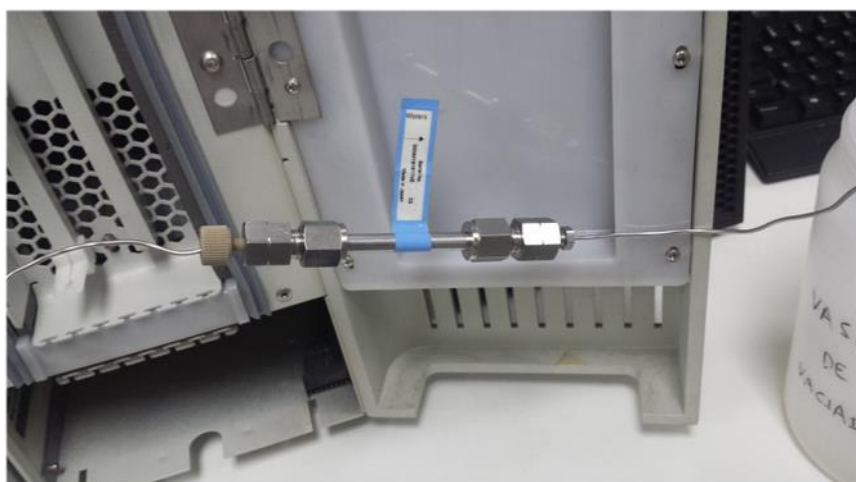


Fig. 2. Ampliación de la imagen anterior

-Hacer circular por la columna la disolución de EDTA disódico 10mM (pH 7.0) a un flujo de 1 mL/min durante 60 minutos.

-Hacer circular agua UP durante 2 minutos. -A continuación lavar la columna con HNO_3 100 Mm a 1mL/min durante 60 minutos

-Finalizar el proceso con un lavado de la columna con agua UP a 1mL/min durante 20 minutos.

-ALMACENAMIENTO DE LA COLUMNA IÓNICA IC-Pack Anion HR

Disolvente de almacenamiento (según información facilitada por Waters):

- Para períodos cortos: agua UP o disolución al 10% de ACN en agua UP.
- Para períodos superiores a 72 horas: eluyente borato/gluconato

Disolvente de almacenamiento (según nuestra experiencia):

- Para períodos cortos: agua UP
- Para períodos superiores a una semana: disolución al 10% de ACN en agua UP.

Información facilitada por Waters

Preparación del eluyente borato/gluconato a partir de una disolución concentrada de Borato/Gluconato

PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN BORATO/GLUCONATO DE LITIO CONCENTRADA

1. En un matraz aforado de 1 L añadir:

34 g ácido bórico

23.5 mL ácido d-glucónico*

8.6 g hidróxido de litio monohidrato

*El componente ácido d-glucónico se encuentra disponible al 50% en disolución acuosa (Sigma Aldrich o Eastman Kodak)

2. Añadir aproximadamente 500 mL de agua UP y agitar hasta disolución total. A continuación añadir 250 mL de glicerina.
3. Enrasar con UP y agitar. La disolución concentrada puede almacenarse durante 6 meses antes de requerir su reemplazo.

PREPARACIÓN DEL ELUYENTE BORATO/GLUCONATO DE LITIO

1. Colocar aproximadamente 500 mL de agua UP en un matraz aforado de 1 L y añadir:
 - 20 mL de la solución borato/gluconato concentrada
 - 20 mL de n-butanol
 - 120 mL acetonitrilo
2. Enrasar con agua UP. Filtrar con filtro de 22 µm.





Annex 6.

PNT Determinació de Cr (VI)

per Cl en mostres de pell



 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento describe un método basado en la cromatografía iónica para la determinación de cromo (VI) en soluciones lixiviadas de cuero bajo unas condiciones determinadas. El método descrito es adecuado para cuantificar el contenido de cromo (VI) del cuero a partir de 3 mg/kg.

Este documento se aplica a todos los tipos de cuero.

2. NORMAS PARA LA CONSULTA

Las normas que a continuación se indican son indispensables para la aplicación de este procedimiento. Para las referencias con fecha, sólo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha se aplica la última edición de la norma (incluyendo cualquier modificación de esta).

ISO 17075:2007 *Cuero. Ensayos químicos. Determinación del contenido en cromo VI.*

ISO 2418 *Cuero. Ensayos físicos, químicos y mecánicos y de solidez. Localización de la zona de toma de muestras*

ISO 3696 *Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y métodos de ensayo.*

ISO 4044 *Cuero. Preparación de muestras para ensayos químicos.*

ISO 4684 *Cuero. Ensayos químicos. Determinación de las materias volátiles.*

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Para los fines de este documento, se aplican las siguientes definiciones:



3.1 Contenido en cromo (VI)

Cantidad de cromo (VI) en el cuero, determinada mediante este método, tras la extracción con una solución salina acuosa a un pH de 7,5 a 8,0.

NOTA: El contenido en cromo (VI) se expresa como cromo (VI) en miligramos por kilogramo de piel (mg/kg), referidos a materia seca.

4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El cromo (VI) soluble se lixivia de una muestra con una solución tampón de fosfato a un pH de 7,5 - 8,0. Una alícuota del extracto se cuantifica por cromatografía iónica (detección UV a 372 nm).

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

Los resultados obtenidos por el método descrito dependen estrictamente de las condiciones de extracción. Los resultados obtenidos mediante la utilización de otros procedimientos de extracción (solución de extracción, pH, tiempo de extracción, etc.) no se pueden comparar con los resultados obtenidos por el procedimiento descrito en este documento.

5. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados deben tener al menos pureza analítica.

5.1 Solución de extracción

Disolver 22,8 g de hidrógeno fosfato dipotásico $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ en 1000 mL de agua UP, y ajustar el pH con la solución de ácido fosfórico (5.3) a pH $8,0 \pm 0,1$. Se desgasifica pasando una corriente de argón o nitrógeno durante 4 minutos.

NOTA orientativa: Generalmente, en la preparación de 1 L de solución de extracción, el pH antes de ajustar es aproximadamente 9,4 y se requieren unas 14-18 gotas de ácido fosfórico para llegar al pH de $8,0 \pm 0,1$.

5.2 Sulfato amónico anhidro

5.3 Solución de ácido fosfórico

Disolver 700mL de ácido o-fosfórico, $d=1,71 \text{ g/mL}$, en agua UP hasta 1 L.

5.4 Solución madre de 1000 mg/L de cromo (VI)

Pesar 2,829 g de dicromato potásico (secado durante $16h \pm 2h$ a $102 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) en un vaso de precipitados y disolver en agua UP. Transferir a un matraz aforado de 1000 mL y enrasar con agua UP. Esta solución tiene una concentración del 1000 mg Cr (VI)/L (1mL de esta disolución contiene 1 mg de cromo).

5.5 Solución patrón de 1,00 mg/L de cromo (VI)

Pipetear 1mL de solución madre (1000 mg Cr (VI)/L) a un matraz aforado de 1000 mL y enrasar con solución de extracción. Esta solución tiene una concentración de 1 mg Cr (VI)/L.



5.6 Argón o nitrógeno, libre de oxígeno

Preferiblemente se debería utilizar argón como gas inerte en lugar de nitrógeno, ya que el argón tiene mayor masa específica que el aire.

5.7 Agua ultrapura (Agua UP) obtenida por el proceso Milli-Q de Millipore.

5.8 Dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$), secado durante $16h \pm 2h$ a $102 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

5.9 Hidróxido sódico

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica

5.10 Solución madre de eluyente

Pesar 33 g de sulfato amónico (5.2) en un vaso de precipitados y disolver en agua UP.

Pesar 0,4 gramos de hidróxido sódico en un vaso de precipitados y disolver en agua UP.

Transferir el contenido de los dos vasos anteriores a un matraz aforado de 1 L y enrasar con agua UP. El pH de esta disolución es 8,20 y su concentración 250mM en sulfato amónico y 10mM en hidróxido sódico. A partir de esta solución se preparará el eluyente o fase móvil.

Conservar la solución madre de eluyente en frasco de polietileno a 4°C. Puede conservarse hasta 4 meses.

5.11 Eluyente o fase móvil (25mM en sulfato amónico)

Pipetear 100 mL de la solución madre de eluyente y transferirlos a un matraz aforado de 1L. Enrasar con agua UP.

Comprobar que el pH de esta disolución es $8,0 \pm 0,2$.

Filtrar el eluyente con membrana de fibra de vidrio de 0,45 μm (6.5)

La caducidad de este eluyente es de una semana.

Precaución: El matraz donde se prepara el eluyente debe estar limpio. No rellenar el matraz que ya ha contenido fase móvil la semana anterior.

6. APARATOS

6.1 Agitador orbital con programador, de $50 \pm 10 \text{ min}^{-1}$.

6.2 Matraz erlenmeyer de 250 mL, con tapón. Para realizar la extracción.




6.3 Tubo de aireación con adaptador esmerilado para desgasificar

6.4 pHmetro con electrodo de vidrio

6.5 Filtros de membrana, con tamaño de poro de 0,45 μm :

-**Filtros de membranas de fibra de vidrio** de 0,45 μm para filtrar el eluyente (Ejemplos de filtros adecuados son: Millipore HAWP04700 o Millipore HAWG047S6).

-**Filtros de membrana de fibra de nylon** de 0,45 μm para filtrar el extracto (SARTOLON POLYAMID 25006 47 N de la casa comercial Sartorius)

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada		PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			
 Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation					

6.6 Matraces aforados de 50 mL y 1000 mL

6.7 Pipetas aforadas y pipetas Pasteur de plástico de un solo uso.

6.8 Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) con inyector automático y detector UV: Waters ALLIANCE 2695 Separation Module equipado con detector PhotoDiode Array (PDA) 2996. Equipos HPLC-PDA de otros fabricantes serán igualmente apropiados.

6.9 Columna de separación: IC-Pak A HR (High Resolution) de Waters. Específica para la separación y cuantificación de aniones. Características de la columna: dimensiones 4,6x75 mm. Tamaño de partícula 6µm. Capacidad 30±3 µeq/mL. El material de relleno es una resina de polimetacrilato con grupos funcionales amonio cuaternario. Columnas equivalentes de otros fabricantes serán igualmente apropiadas.

6.10 Kitasatos

6.11 Bomba de vacío

6.12 Molino (para desfibrar la muestra según norma ISO 4044)

6.13 Filtros de jeringa de nylon de 0,45 µm

6.14 Jeringa de 10 mL con cono luer de vidrio

6.15 Viales para HPLC con tapón pre-slit.

6.16 Balanza analítica con resolución de ± 0.0001 g.

7. PROCEDIMIENTO OPERATORIO



7.1 Muestreo y preparación de la muestra

Si es posible, se realiza el muestreo de acuerdo con la Norma ISO 2418 y se muele el cuero según la Norma ISO 4044. La molienda se debe realizar poco antes del proceso de extracción. Si no es posible realizar el muestreo de acuerdo con la Norma ISO 2418 y la molienda de acuerdo con la Norma ISO 4044 (por ejemplo en pieles de productos confeccionados como calzado o prendas de vestir) se debe incluir en el informe de ensayo los detalles sobre el muestreo y preparación de muestra. La próxima actualización de la norma ISO 4044 va a prever la preparación de muestra por recortado en lugar de molido en muestras confeccionadas.

7.2 Preparación de la solución analítica

-Pesar 2 g ± 0.01 g de cuero molido con una precisión de 0.001 g en un erlenmeyer de 250 mL

-Pipetear 100 mL de la solución extractiva desgasificada (véase el apartado 5.1) y añadirlos al erlenmeyer que contiene la piel. Agitar suavemente el balón para facilitar la humectación de la piel.

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

-Desgasificar durante 5 minutos con argón. (Durante el proceso se recomiendan agitaciones suaves periódicas para facilitar la humectación).

-Tapar el erlenmeyer y colocarlo en el agitador durante $3h \pm 5 \text{ min}$ a $50 \pm 10 \text{ min}^{-1}$. La suspensión se agitará con movimientos circulares suaves para evitar que la piel se adhiera a las paredes del matraz. Evitar un movimiento demasiado rápido. Se regula la velocidad de agitación de manera que se consiga un régimen turbulento que moje la piel pero sin que ésta llegue a contactar con el tapón del erlenmeyer. (Como norma general, en muestras de piel cortadas con tijera, una agitación a 130 min^{-1} es adecuada. Sin embargo, en pieles molinadas, se ha comprobado que la velocidad de agitación requerida es algo menor).

-Inmediatamente después de tres horas de extracción, filtrar el contenido del matraz a través de un filtro de membrana de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ (SARTOLON POLYAMID 25006 47 N de Sartorius).

NOTA: No es necesario filtrar la solución analítica con cartucho SPE.



Transferir inmediatamente unos 1-1,5 mL de filtrado a un vial con la ayuda de una pipeta pasteur de plástico de un solo uso. Cerrar el vial e identificarlo con la referencia de la muestra.

-Comprobar el pH de la solución. Transferir el filtrado a un vaso de 100 mL, añadir un imán y medir seguidamente el pH en un pHmetro (6.4). El pH deberá estar entre 7,5 y 8,0. Si el pH de la solución no está entre este rango, se desecha la muestra del vial y deberá empezarse de nuevo todo el procedimiento pero pesando una cantidad algo menor de piel (entre $1,7-1,8 \text{ g} \pm 0.01$).

NOTA: En el Anexo I se muestra un esquema del proceso de extracción.

7.3 Determinación del cromo (VI) en la solución obtenida por el procedimiento de extracción

-Programar las secuencia de análisis e inyección del cromatógrafo. Las condiciones son las siguientes:

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada 	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

Condiciones cromatográficas	
Equilibrado inicial	50 minutos
Temperatura	30±1°C
Fase móvil: sulfato amónico	25mM en sulfato amónico (pH 8,0 ± 0,2)
Longitud de onda de trabajo	372 nm
Flujo	0,9 mL/minuto
Volumen de inyección	50µL (en muestras con muy bajo contenido en cromo(VI) se inyectaran 100 µL)
Número de inyecciones por cada muestra	2
Duración de la inyección	5 minutos
Equilibrado entre inyecciones	5 minutos
Lavado final	50 minutos con agua UP

PRECAUCIÓN DURANTE LA RUTINA DE INICIO DEL CROMATÓGRAFO:

No poner en contacto soluciones fuertemente salinas (por ejemplo, sulfato amónico 25mM) con metanol ni con acetonitrilo (podrían producirse cristalizaciones salinas en el circuito).

-En cada sesión de trabajo debe inyectarse un patrón de control de 0,02 mg/L en cromo (VI).

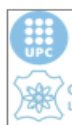
En estas condiciones, el tiempo de retención del anión cromato debe estar entre 3-4 minutos. Cuando el tiempo de retención del cromato descienda de 3 min, la columna necesita una restauración. Ver documento PNT IC-MANT_01. Para confirmar la identificación del ion cromato, comparar los espectros UV/VIS de la solución de ensayo, de la solución patrón de cromo (VI) (Anexo II), y de las muestras con presencia de ion cromato de distintas concentraciones almacenados en la librería espectral digital.

El Anexo III muestra ejemplos de cromatogramas y los correspondientes espectros UV del anión cromato en las anteriores condiciones cromatográficas.

7.4 Calibración

Preparación de patrones de calibración

Las soluciones de calibrado se preparan a partir de la disolución 5.5 de 1,00 ppm de cromo (VI). Se pipetea los volúmenes indicados en la tabla a matraces aforados de 50 mL y se enrasa con solución extractiva.

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

Concentració de los patrones en µg/mL Cr (VI)	Alícuota de la solució patrón de 5.5	Enrase
0,02	1,0 mL	50,0 mL
0,05	2,5 mL	50,0 mL
0,10	5,0 mL	50,0 mL
0,20	10,0 mL	50,0 mL
0,40	20,0 mL	50,0 mL
0,60	30,0 mL	50,0 mL

Construcció de la recta de calibració

-Llenar los viales con los patrones:

- Adaptar un filtro de disco de nylon de 0,45 µm a la jeringa.
- Llenar la jeringa con el extracto (con la ayuda de una pipeta pasteur).
- Filtrar el extracto e introducirlo directamente en un vial.

-Inyectar por duplicado 50 µL de cada patrón utilizando las condiciones cromatográficas mostradas en el apartado 7.3.



-Representar la concentración de cromo (VI) frente a las áreas obtenidas.

En el anexo IV se presentan a modo de referencia orientativa los resultados obtenidos en la calibración efectuada en julio del 2014.

El Anexo V ofrece equivalencias entre concentraciones de cromo (VI) y contenido de cromo (VI) en la piel (tomando como referencia 2 g de piel tratados con 100 mL de solución extractiva)

NOTAS:

- La concentración real se obtiene por cálculo, en función de la pesada efectuada de dicromato.
- Aunque en el cromatograma se detecta el ion cromato, las concentraciones de los patrones y los cálculos en las muestras se refieren siempre a masa de cromo (Cr).

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

7.5 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE RECUPERACIÓN

La determinación del índice de recuperación es interesante para obtener información sobre posibles efectos de la matriz que puedan tener influencia en los resultados.



El índice de recuperación se determina bajo demanda explícita del solicitante del análisis, o por iniciativa del laboratorio cuando se sospecha de la posible influencia de efectos de matriz en una muestra determinada.

Se adiciona a una alícuota de 10 mL de la solución obtenida en el apartado 7.2 un volumen adecuado de la solución patrón de cromo (VI) para duplicar aproximadamente la concentración de cromo (VI) contenida en el extracto ($\pm 25\%$). La concentración de la solución analítica que se añade se selecciona de tal forma que el volumen final de la solución dopada sea 11 mL como máximo. Se inyecta la solución obtenida. El área de la solución se debe encontrar dentro del rango de la curva de calibrado, de lo contrario se repite el procedimiento utilizando una alícuota inferior. El índice de recuperación debe ser superior al 80%.

Recuperación sobre 10 mL del extracto filtrado		
Resultado obtenido Cr VI (mg/Kg)	Concentración del patrón de Cr(VI) (mg/L)	Volumen de patrón (mL) a añadir sobre los 10.0 mL del extracto
< 2	—	—
2,1 - 4	1,00	0,60
4,1 - 6	1,00	1,00
6,1 - 10	5,00	0,40
10,1 - 20	5,00	0,70
> 20,1	5,00	1,00

NOTAS:

- El hecho de no poder detectar el cromo (VI) añadido, puede ser una indicación de que la piel contiene agentes reductores.
- El índice de recuperación es un indicador de si el procedimiento es efectivo o si los efectos de la matriz están afectando a los resultados. Normalmente el índice de recuperación es superior al 80%.

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

8. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1 Cálculo del contenido en cromo

- La concentración de Cr (VI) presente en las muestras se obtiene a partir del valor del área de pico obtenido en el cromatograma.

Cálculo en caso de utilizar la recta de calibración del Anexo IV

$$\text{Cr (VI) (mg/kg)} = \frac{(A+1295) \cdot V}{90192 \cdot P}$$

Donde

V=Volumen de inyección (μL)

A=Área de la muestra proporcionada por el cromatograma (sin incluir unidades).

P= masa de la piel (g)

Existe una hoja de cálculo de Excel para obtener estos cálculos en la carpeta “admilab”.

NOTA: La fórmula anterior incluye la corrección adecuada en caso de no coincidir el volumen inyectado en el cromatograma de la muestra con el volumen inyectado en la construcción de la recta de calibración.



Los resultados se expresan habitualmente sobre peso seco de muestra (deberá determinarse la humedad de la muestra e indicarse junto con los resultados).

La humedad se determina de acuerdo con el método EN ISO 4684 en una fracción de la muestra distinta de la que se analiza para determinar el cromo (VI).

Los resultados inferiores a 3mg/kg se expresarán como no detectado especificando claramente “< 3 mg/kg de Cr (VI)”

Cálculo para cualquier recta de calibración

$$\text{Cr (VI) (mg/kg)} = \frac{(A-b) \cdot 100}{m \cdot P}$$

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

Donde

A=Área de la muestra proporcionada por el cromatograma

b= ordenada en el origen de la recta de calibración

m = pendiente de la recta de calibración

P= masa de la piel (g)

NOTA: Esta ecuación es válida cuando el volumen inyectado de muestra coincida con el volumen inyectado en la recta de calibrado. En caso de no coincidir el volumen inyectado en el cromatograma de la muestra con el volumen inyectado en la construcción de la recta de calibración, será necesario hacer la corrección pertinente.

8.2 Índice de recuperación (de acuerdo con el apartado 7.5)

$$\eta = \frac{\text{mg Cr totales (extracto + añadidos)} - \text{mg Cr extracto}}{\text{mg Cr añadidos}}$$

8.3 Expresión de los resultados



El contenido en cromo (VI) se expresa en miligramos por kilogramo (mg/kg) con una aproximación de 0,1 mg. El contenido se refiere a materia seca. La materia volátil (Norma ISO 4684) se expresa en porcentaje (%) con una aproximación de 0,1%.

La matriz de extracción para cuero es compleja (por ejemplo, debido a la coloración) y los resultados por debajo de 3 mg/kg muestran grandes variaciones y tienen una fiabilidad limitada. Por tanto, se debería considerar un límite de detección de 3 mg/kg. En el caso de determinar niveles de cromo (VI) superiores a 3 mg/kg, se compara el espectro UV/VIS del presunto pico de cromato en el cromatograma de la muestra con el de la solución patrón (véase apartado 7.4) para descartar que el resultado positivo se deba a la interferencia de sustancias.

9. Informe del ensayo

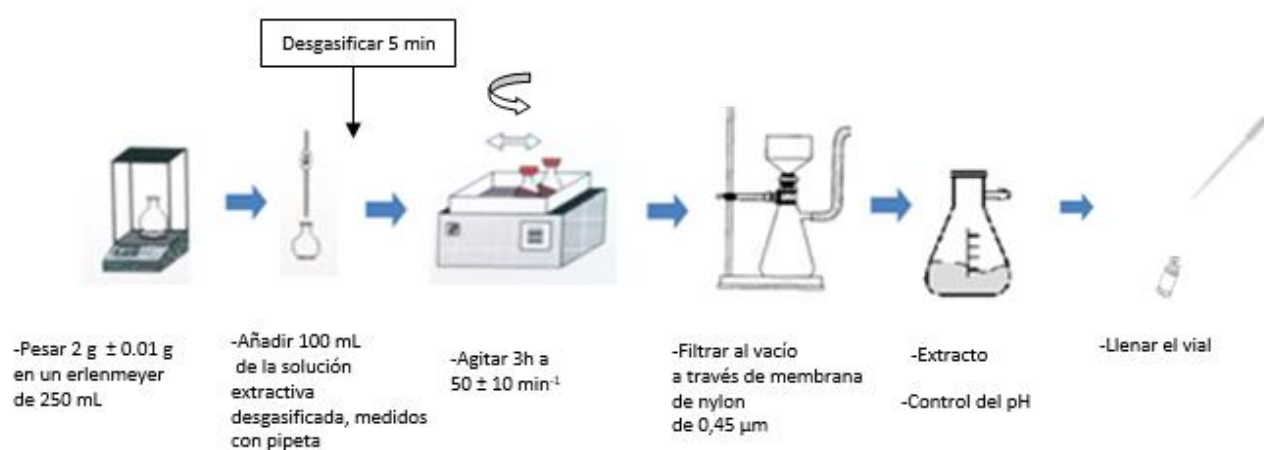
El informe del ensayo debe incluir los siguientes datos:


- el contenido en cromo (VI) obtenido.
- una descripción de la muestra ensayada y detalles sobre el muestreo si es necesario.
- los resultados obtenidos expresados con un decimal en miligramos por kilogramo (mg/kg)
- la materia volátil del cuero en porcentaje (%).
- En caso de ser requerido explícitamente, se incorpora el índice de recuperación en porcentaje (%) si es inferior al 80% o superior al 120%.
- detalles sobre cualquier desviación del procedimiento

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

Anexo I

Esquema de la extracció



 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

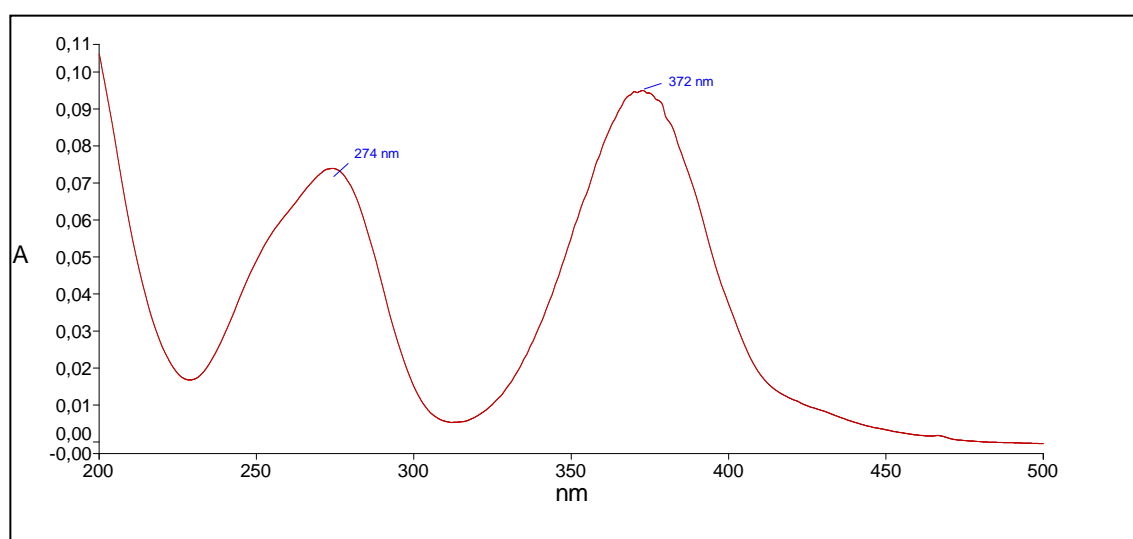


Càtedra A³ UPC
Leather and Fashion & Textile Innovation





Anexo II

Espectro UV del anión cromato

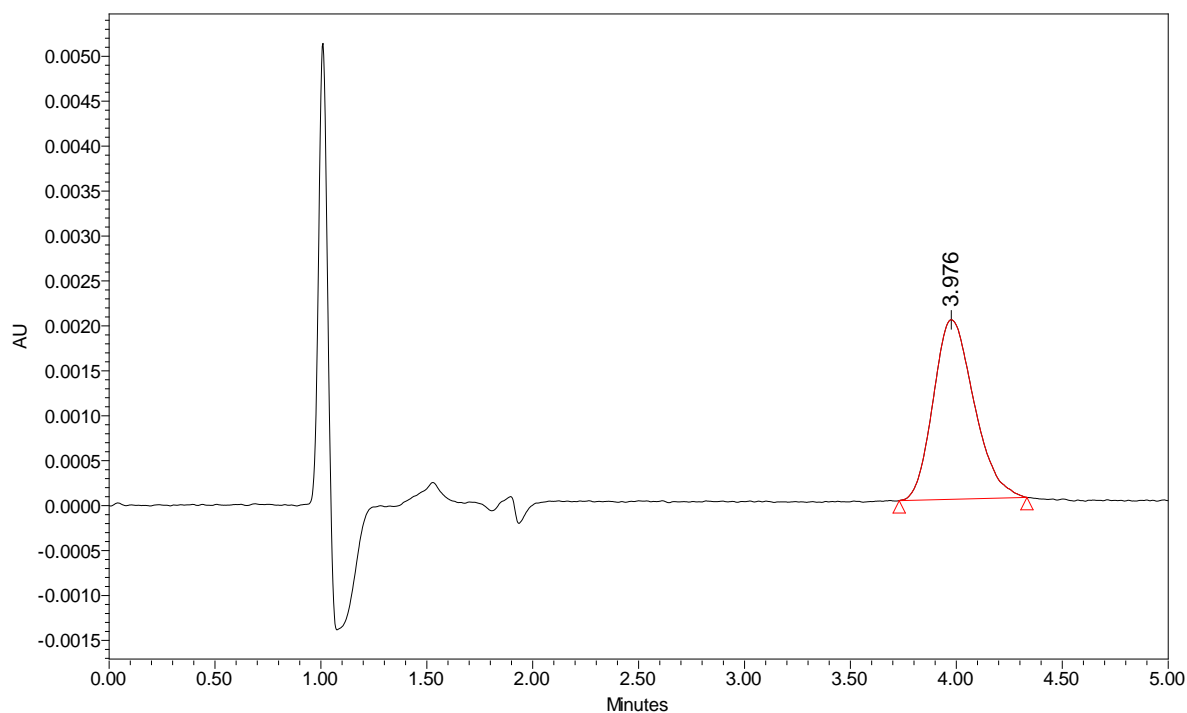


Espectro UV del anión cromato disuelto en fase móvil

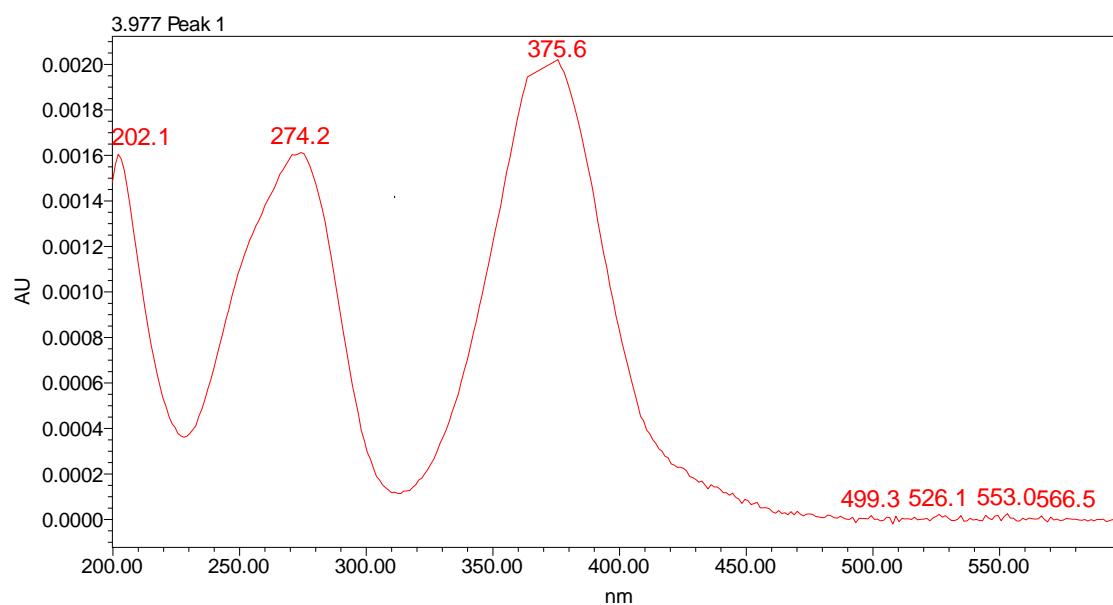
 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			

Anexo III



Ejemplos de cromatogramas y los correspondientes espectros UV del anión cromato proporcionados por el cromatógrafo (condiciones experimentales según el apartado 7.3)

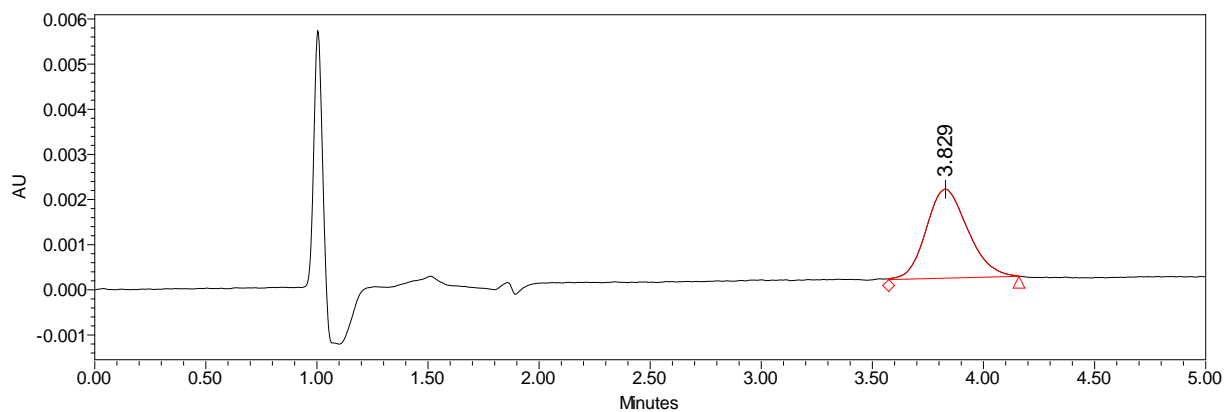


Cromatograma de un patrón de 0,1 mg/L de cromo (VI). Picos: Cromato, 3,976 minutos.

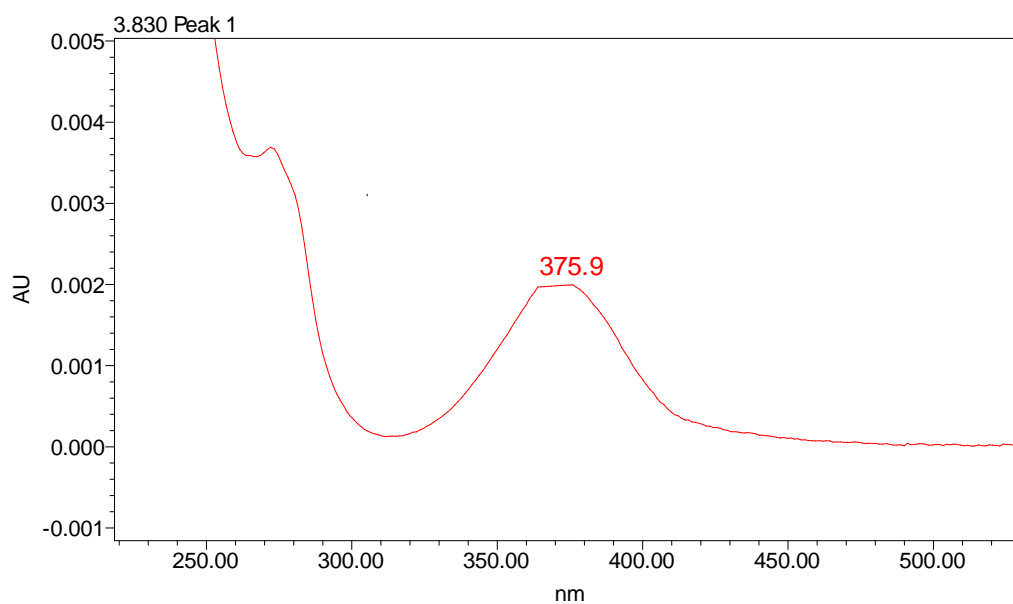


Espectro UV del anión cromato correspondiente al patrón de 0,1 mg/L de cromo (VI)

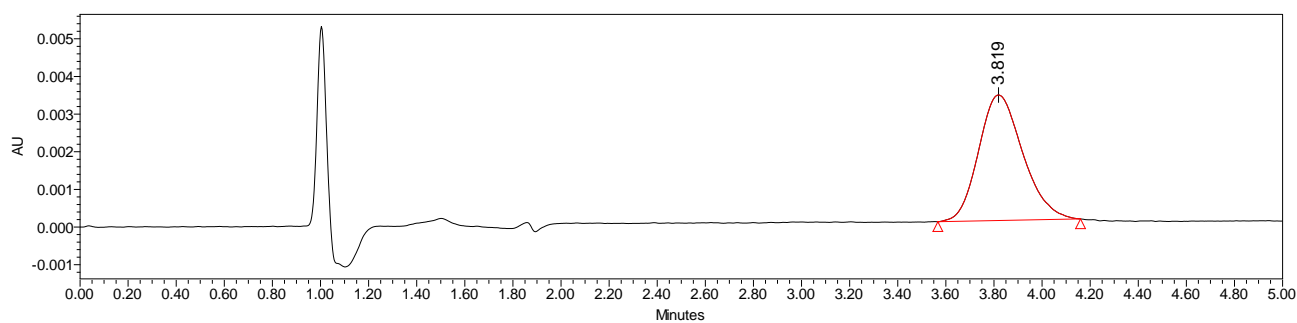
 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			





Cromatograma obtenido de una muestra de piel que contiene 5 mg Cr (VI)/Kg

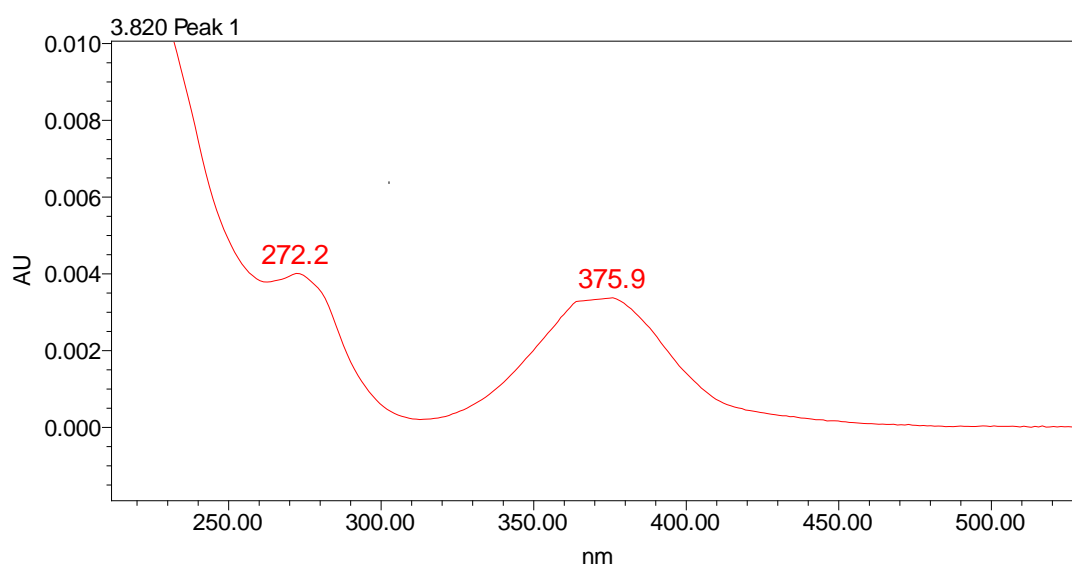


Zoom del espectro UV del anión cromato correspondiente a una muestra de piel que contiene 5 mg Cr (VI) /Kg



Cromatograma obtenido de una muestra de piel que contiene 7,7 mg Cr (VI)/Kg

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			





Zoom del espectro UV del anión cromato correspondiente a una muestra de piel que contiene 5 mg Cr (VI) /Kg

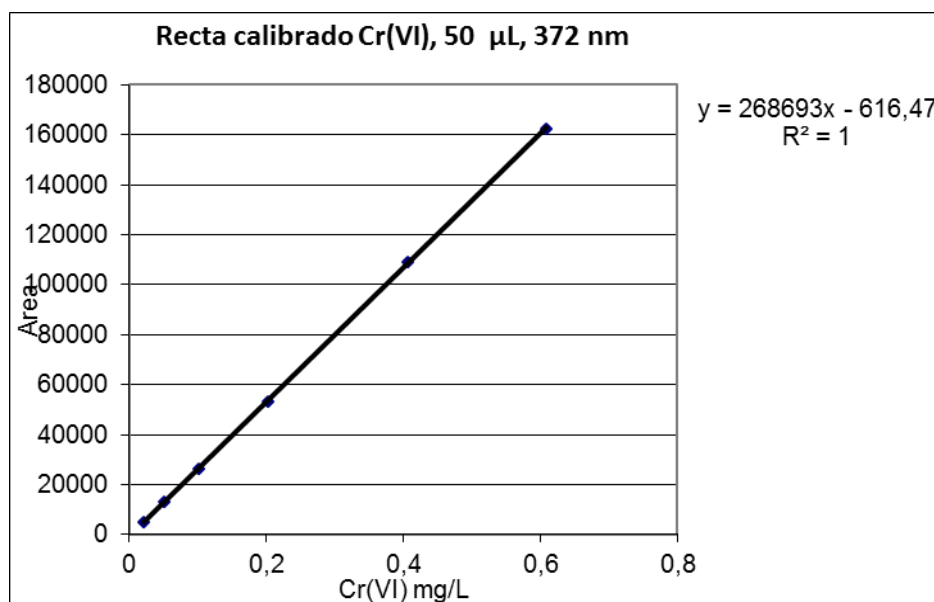
Anexo IV

Resultados de la calibración realizada en julio de 2014

Los siguientes datos corresponden a la recta obtenida en julio de 2014 en el equipo eAlliance adquirido en junio del 2014.

	ppm de Cr(VI)	Áreas	Promedio áreas
P1	0,0203	4992 4957	4974,5
P2	0,0507	13198 13011	13104,5
P3	0,1014	26777 26318	26547,5
P4	0,2029	53190 53510	53350
P5	0,4058	109291 108882	109086,5
P6	0,6087	162744 162593	162668,5

 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA BARCELONATECH Escola d'Enginyeria d'Igualada  Càtedra A ³ UPC Leather and Fashion & Textile Innovation	PNT Determinació de Cr(VI) en pells per cromatografia iònica			



Anexo V

Equivalencias entre concentraciones de cromo (VI) y contenido de cromo (VI) en la piel (tomando como referencia 2 g de piel tratados con 100 mL de solución extractiva)

Concentración de Cr(VI) mg/L	mg Cr(VI)/Kg piel
0,02	1,0
0,05	2,5
0,10	5,0
0,20	10
0,40	20
0,60	30

Annex 7.

Resultats dels Interlaboratoris del Cr(VI)



Resum de les dades dels assajos interlaboratoris recollits a l'Annex B de la Norma UNE-ISO 17075:2008

Dades d'incertesa, repetibilitat i reproductibilitat recollides a l'Annex B de la Norma ISO 17075:2007 per a la determinació de Cr(VI) colorimètricament		
Dades de precisió de l'assaig 1 per a dos tipus de cuirs (valors mitjans en mg/kg)		
Contingut en crom (VI)	Repetibilitat (P 95%, factor 2,8)	Reproductibilitat (P 95%, factor 2,8)
7,04	1,58	3,22
7,83	1,11	3,54
Resultats de l'assaig 2 efectuat per 16 laboratoris per a un tipus de cuir (mg/kg)		
Valor mitjà del contingut en crom (VI)	Incertesa	
19,4	5,00	

Assajos interlaboratoris organitzats pel CSIC en els què s'ha participat amb el nou mètode cromatogràfic per a la determinació del crom hexavalent en pells

A continuació es mostren els **resultats i conclusions** dels assajos col·laboratius destinats a validar el mètode cromatogràfic. Aquest annex s'ha elaborat a partir dels informes proporcionats pel Dr. Agustí Marsal i el Dr. Albert M Manich, coordinadors dels assajos.

1r exercici interlaboratori

L'objectiu d'aquest assaig va ser determinar l'interval de valors (incertesa de la mesura) dins del qual es troba el veritable valor del contingut de crom hexavalent de les mostres sotmeses a l'assaig.

En l'estudi van intervenir sis laboratoris espanyols i es van analitzar quatre mostres de pells (A, B,C,D). Quatre dels laboratoris participants van aplicar ambdós mètodes, el colorimètric i el cromatogràfic, mentre que els altres dos laboratoris només van emprar el colorimètric perquè no disposaven de cromatògraf. Totes les anàlisis es van realitzar per triplicat.

Només la pell B va permetre la determinació quantitativa de crom hexavalent; la resta de pells presentaven un contingut en l'anió inferior al límit de quantificació. No obstant això, els valors de z-score obtinguts per a aquesta mostra determinaven que tots els laboratoris participants presentaven resultats concordants.

L'informe interlaboratori va proporcionar dades de la magnitud numèrica de la incertesa per ambdós mètodes:

Incertesa del mètode colorimètric per a la mostra B
<ul style="list-style-type: none"> • Valor assignat 7,12 mg/kg • Variància mostral $S^2 = 1,4617$ • Variància de la mitjana $S'^2 = 1,4617/6 = 0,2436$ • Desviació típica de la mitjana $U = S' = 0,4936$ • El factor de cobertura per a un nivell de probabilitat del 95% i tamany de mostra 6 val $k = 2,57$, de manera que la incertesa expandida al 95% serà $I = \pm k \cdot U = \pm 1,27$ mg/kg
Incertesa del mètode cromatogràfic per a la mostra B
<ul style="list-style-type: none"> • Valor assignat 8,68 mg/kg • Variància mostral $S^2 = 0,5523$ • Variància de la mitjana $S'^2 = 0,5523/4 = 0,1381$ • Desviació típica de la mitjana $U = S' = 0,3716$ • El factor de cobertura per a un nivell de probabilitat del 95% i tamany de mostra 4 val $k = 3,18$, de manera que la incertesa expandida al 95% serà $I = \pm k \cdot U = \pm 1,18$ mg/kg

Dades d'incertesa per a la mostra B obtingudes en el primer assaig interlaboratori

Els resultats de les mostres A i C van presentar un grau d'acord complet en relació amb la qualificació final del contingut com $<3,0$ mg/kg. En ambdós casos no es va poder estimar la incertesa de la mesura. Els sis laboratoris participants van demostrar la seva aptitud per establir que ambdues pells estaven lliures de l'analit determinat i que no s'havien comés falsos positius. Aquesta conclusió es vàlida tant pel mètode colorimètric com per al cromatogràfic.

Respecte a la mostra D, el valor assignat de crom (VI) era $<3,0$ mg/kg i en ambdós mètodes s'han observat valors $<3,0$ mg/kg i valors superiors a aquest límit. Per tant,

no es va efectuar el càlcul del paràmetre z-score. El fet de disposar d'alguns resultats lleugerament inferiors a 3,0 indica que el contingut de crom (VI) de la mostra D es troba molt pròxim a aquest límit. Tot i així, va ser calculada la incertesa de la mesura agrupant els resultats d'ambdós mètodes. Per la pell D, el veritable valor del contingut de Cr (VI), amb una probabilitat del 95%, es troba entre 2,71 i 3,51 mg/Kg a cavall del límit de 3,0 mg/Kg.

S'ha observat que l'anàlisi cromatogràfica ha proporcionat un valor d'incertesa lleugerament inferior a l'obtingut fotolorimètricament.

2n exercici interlaboratori

En aquest estudi van participar 11 laboratoris d'Europa i Àsia i es van analitzar 2 mostres per triplicat emprant el mètode cromatogràfic. Un dels laboratoris va estar exclòs en la mostra A per aportar un valor de z-score inadequat. Es mostren els resultats:

Paràmetre	Mostra A Valor assignat 5,28mg/Cr(VI)/kg	Mostra B Valor assignat 29,83 mg/Cr(VI)/kg
<i>Variància de repetibilitat (Vr)</i>	0,08573	0,57392
<i>Desviació estàndard de repetibilitat (Sr)</i>	0,2928 mg/kg	0,7076 mg/kg
<i>Variància entre laboratoris (VL)</i>	1,5531	8,1487
<i>Variància de reproductibilitat (VR)</i>	1,6388	8,7226
<i>Desviació estàndard de la reproductibilitat (SR)</i>	1,2802 mg/kg	2,9534 mg/kg
<i>Contingut en Cr(VI), mitjana aritmètica</i>	5,28 mg/kg	27,12 mg/kg
<i>Repetibilitat (k=2)</i>	0,5856 mg/kg	1,5152 mg/kg
<i>Reproductibilitat (k=2)</i>	2,5604 mg/kg	5,9068 mg/kg

Resultat del segon exercici interlaboratori. Els intervals de repetibilitat i reproductibilitat es calculen usant un valor de k de 2 (Prob. = 95%)

L'informe final de l'interlaboratori va proporcionar dades referents a la repetibilitat i a la reproductibilitat (taula xx). Va indicar que tot i que la precisió dels estudis de recerca depèn de l'homogeneïtat i l'estabilitat de les mostres analitzades, així com del procediment analític aplicat, la relació entre la repetibilitat i la reproductibilitat front el contingut mitjà de Cr(VI) estima la precisió del procediment de mesura. La taula següent permet comparar la precisió dels resultats proporcionats per la Norma ISO 17075:2007 i els obtinguts amb el procediment cromatogràfic en aquest assaig col·laboratiu, a partir de les relacions *repetibilitat/mitjana aritmètica de Cr(VI)* i *reproductibilitat/mitjana aritmètica Cr(VI)*.

Precisió indicada en la Norma ISO 17075:2007		
Mostra	Repetibilitat/Contingut mitjà Cr(VI)	Reproductibilitat/Contingut mitjà Cr(VI)
1	0,22	0,45
2	0,14	0,45
Mitjana aritmètica	0,18	0,45
Precisió determinada en l'estudi col·laboratiu aplicant el mètode cromatogràfic		
Mostra	Repetibilitat/Contingut mitjà Cr(VI)	Reproductibilitat/Contingut mitjà Cr(VI)
A	0,11	0,48
B	0,06	0,22
Mitjana aritmètica	0,085	0,35

Precisió en la determinació del crom hexavalent segons la Norma ISO 17075 (2007) i segons l'estudi col·laboratiu aplicant el nou mètode cromatogràfic

La comparació de la precisió dels resultats donats per la norma ISO 17075:2007 i els obtinguts en l'assaig d'aptitud, amb el mètode cromatogràfic, mostra una millora important en la repetibilitat i en la reproductibilitat de la mostra de major contingut de Cr (VI) de l'estudi col·laboratiu cromatogràfic, (la B).

Annex 8.

Difusió dels resultats

ATENCIÓ!!

L'Annex 8 conté els següents documents:

- **Font Vallès, Joaquim [et al.].** *Determination of hexavalent chromium in leather by ion-exchange chromatography.* "Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists", September 2014, vol. 98, núm. 4, p. 151-157.
- **Font Vallès, Joaquim [et al.].** *New method to determinate chromium IV in leather.* "International leather maker" May-June 2017, p. 49.
- **Perez, C. [et al.].** *Nuevas aplicaciones de la cromatografía iónica en el sector de curtidos.* (Partes 1 y 2) Journal of the AQEIC vol 66, #2 p. 19-24, #3 p. 41-50
- *Leather - Chemical determination of chromium(VI) content in leather - Part 2; Chromatographic method = Cuir - Essais chimiques - Détermination de la teneur en chrome(VI)*
: DIS stage ISO/DIS 17075-2:2014(E) IUC 18-2 ISO TC IULTCS Secretariat: CEN/TC 289

Com que estan subjects als drets dels editors,
heu de consultar-los a les pàgines web de de les respectives editorials
(Servei de Biblioteques UPC)

Igualada, 11 de abril de 2012

2ª Circular informativa

**61º Congreso de la Asociación Química Española de la
Industria del Cuero**

Igualada, 17 de mayo de 2012

Distinguido Asociado:

Nos place enviarle esta nueva circular informativa sobre nuestro Congreso anual, a celebrar en Igualada (Barcelona), en las instalaciones de la Cátedra A3 in Leather Innovation, Av. Pla de la Massa s/n.

Detallamos a continuación el programa técnico de conferencias y su distribución.

Jueves, 17 de mayo

Sesión de mañana

ASAMBLEA DE SOCIOS

09,30 – 11,15	Junta General. Lectura del resultado de las votaciones y proclamación de los resultados.
11,15 – 11,30	Pausa – Café
11,30 – 12,00	Apertura del congreso.
12,00 – 12,30	Presentación de la Cátedra A3 in Leather Innovation.

JORNADA TÉCNICA

12,30 – 13,00	AQEIC Lecture. “Curtición vegetal con extracto de semilla de uva” por S. Ramón, A. Bacardit, J. Font, L. Ollé. <i>Escola d’Enginyeria d’Igualada-Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).</i>
13,00 – 13,20	“Determinación de TCMTB y otros fungicidas en piel” por M. R. Reyes ¹ , J. Font ¹ , A. Bacardit ¹ , S. Cuadros ² y A. Marsal ² . ¹ <i>Escola d’Enginyeria d’Igualada-Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).</i> ² <i>IQAC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)</i>

13,20 – 13,40 “Nuevas aplicaciones de la cromatografía iónica en el sector de curtidos” por C. Pérez, A. Bacardit, L. Ollé, M.R. Reyes y J. Font.
Escola d’Enginyeria d’Igualada-Universitat Politècnica de Catalunya (UPC).

13,40 – 15,30 Almuerzo de trabajo

Sesión de tarde

15,30 – 15,50 “Comportamiento a la compresión de pieles vacunas recurtidas con recurtientes proteínicos en distintas condiciones de humedad” por A. M. Manich, E. Bautista, B. Baena, D. López-Santana, F. Maldonado, J. Cot y A. Marsal.
IQAC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

15,50 – 16,10 “Fungicidas alternativos para la industria de curtidos. Aplicación en diferentes procesos” por S. Cuadros¹, M. A. Manresa³, J. Font², M. E. Bautista¹, R. Puig², A. Marsal¹

¹ *Departamento de Tecnología Química y Tensioactivos, IQAC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)*

² *Escola d’Enginyeria d’Igualada - Universitat Politècnica de Catalunya, (UPC).*

³ *Facultat de Farmacia, Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona (UB).*

16,10 – 16,30 “Caracterización de pieles curtidas con titanio” por V. Segarra¹, M. V. Galiana², S. Navarro², J. Ferrer¹, M. E. Riquelme¹

¹ *Centro de Innovación y Tecnología (INESCOP).*

² *Industrias del Curtido, S.A. (INCUSA).*

16,30 – 16,50 “Piel respetuosa con el medio ambiente curtida con oxazolidina” por V. Segarra, M. Roig, M. A. Martínez, J. Ferrer
Centro de Innovación y Tecnología (INESCOP).

16,50 – 17,10	Pausa – Café
17,10 – 17,30	“La empresa familiar en el sector curtidos: fortalezas y debilidades” por J. Pérez Gil. <i>Asesoramiento en Curtidos S.L. (Lorca).</i>
17,30 – 18,30	Presentación-Coloquio. “Camino a la cocreación” por M. Cirera. <i>Munich (Capellades, Barcelona).</i>
20,30	Cena clausura Congreso / Entrega Premio AQEIC



Highly creative



LANXESS
Energizing Chemistry



Pulcra Chemicals
The solution specialist



PROGRAMA

63 CONGRESO DE LA
ASOCIACIÓN QUÍMICA
ESPAÑOLA DE LA
INDUSTRIA DEL CUERO



18 y 19 de septiembre de 2014 Igualada

Programa técnico de comunicaciones

Jueves, 18 de Septiembre

ASAMBLEA DE SOCIOS

15,30 - 15,45	Recepción y registro de asistentes
15,45 - 17,30	Junta General Extraordinaria. Lectura del resultado de las votaciones y proclamación de los resultados.

Viernes, 19 de Septiembre

JORNADA TÉCNICA

Sesión de mañana	
9,00 - 9,30	Recepción, registro de asistentes y entrega de documentación.
9,30 - 10,00	Ceremonia de apertura del 63 Congreso. Presidente de la sesión: Sr. Luis María Labastida
10,00 - 10,30	“Avances en la determinación del cromo hexavalente en cuero” Autores: C.Pérez, J.Font, M ^a Reyes, M.Cobos, A.Marsal, F.Combalia
10,30 - 11,00	La ficha de seguridad en el marco del “Reach” Autor: Otto Bracke
11,00 - 11,30	Pausa para el café Presidenta de la sesión: Dra. Anna Bacardit
11,30 - 12,00	“Tepehuaje (Lysiloma acapulcensis) una nueva opción de curtición vegetal, sostenible y natural” Autores: E.Núñez, C.Casas, Ll.Ollé, A.Bacardit
12,00 - 12,30	“Influencia en la aplicación de un recurtiente anfótero en las propiedades del cuero. Parte I.” Autores: O.Ballús, Ll.Noguera, R.Micó, R.Palop

12,30 – 13,00 “Efecto del engrase en las características de confort de la piel. Parte I. Compresibilidad y blandura de la piel”

Autores: A.M.Manich, J.Barenys, L.Martínez, J.Lloria, A.Marsal

13,00 – 15,00 Almuerzo de trabajo

Sesión de tarde

Presidenta de la sesión: Dra. Rosa Cuadros

15,00 – 15,30 “Reducción en la utilización de compuestos orgánicos volátiles en la industria del curtido”

Autores: A.Solà, R.Cuadros, Ll.Ollé, A.Bacardit

15,30 – 16,00 “El color en el acabado de cuero y pieles”

Autores: LL.Izquierdo, S.Romera

16,00 – 16,30 Pausa para el café

Presidente de la sesión: Sr. Luis María Labastida

16,30 – 17,00 “Impacto de la piel curtida en la huella de carbono de calzado”
Autores: V.Segarra, M.Roig, M.A.Martínez, J.Ferrer, A.Zapatero, N.Cuesta

17,00 – 17,30 Conferencia de clausura

17,30 – 17,45 Clausura del Congreso

17,45 – 18,30 Visita a las nuevas instalaciones del Campus Universitari Igualada

PROGRAMA SOCIAL

Viernes, 19 de septiembre

10,00 Recogida en el Campus Universitari Igualada
Visita de las Bodegas Torres

Almuerzo en el Hotel Ciutat d'Igualada
21,00 Cena de Clausura en el Restaurante Sesoliveres
Entrega del premio AQEIC 2014



Highly creative



LANXESS
Energizing Chemistry



64 CONGRESO DE LA
ASOCIACIÓN QUÍMICA
ESPAÑOLA DE LA
INDUSTRIA DEL CUERO

PROGRAMA



5 y 6 de mayo de 2016 Barcelona

Congreso AQEIC 2016

5 de mayo			6 de mayo		
9:30	10:00	Recepción y registro de los asistentes. Entrega de la documentación.	10:00	10:30	El Tepehuaje (Lysiloma acapulcensis), una nueva curtición sostenible polifenólica para la industria del cuero Anna Bacardit, Ericka Núñez, Felip Combalia, Lluís Ollé
10:00	11:30	65ª Asamblea	10:30	11:00	Efecto del engrase en las características de confort de la piel.
11:30	11:50	Coffee break			Parte III: Absorción y desorción de humedad
11:50	12:00	Apertura del Congreso			A. M. Manich, J. Barenys, L. Martínez, J. Lloria, J. Carilla, A. Marsal
12:00	12:30	Novedades en la normativa para la determinación de cromo hexavalente en piel Joaquim Font, Carme Pérez, María Reyes, Níria Pascual, Rosa Cuadros, Agustí Marsal	11:00	11:30	Coffee break
			11:30	12:00	Leather Compliancy and Sustainability for European Luxury Good Brands J. Fletcher
12:30	13:00	Probiotics for leather J.C. Castell, S. Pillai, N. Tipsrisukond, C. Balasubramanian, M.Wood	12:00	12:30	Estudio del análisis cualitativo y cuantitativo del extracto obtenido a partir de semilla de uva por HPLC Sílvia Sorolla, Antònia Flores, Joaquim Font, Lluís Ollé, Anna Bacardit
13:00	13:30	Desarrollo de nanocompuestos con efecto autolimpiante para cuero y textil Concepció Casas, Sílvia Sorolla, Lluís Ollé, Anna Bacardit	12:30	13:00	Obtención de cuero con propiedades funcionales mediante tecnología MLSE M.M. Sánchez Navarro, M.J. Escoto Palacios, F. Arán Aís, M. Roig Orts, C. Orgilés Barceló
13:30	15:00	Almuerzo de trabajo	13:00	13:15	Conferencia invitada Dra. Aroha Frías de Louis Vuitton
15:00	15:30	Presencia de formaldehído en cuero. Comparativa de los métodos de análisis e influencia de distintos tratamientos aplicados Sara Cuadros, Albert Mª Manich, Joaquim Font, Felip Combalia, Mª Reyes Reyes, Agustí Marsal	13:15	13:20	Clausura del Congreso
15:30	16:00	Influencia de productos derivados del ácido naftalensulfónico en la tintura. Parte I Ramón Palop, Olga Ballús, Ricardo Micó, Toñy Catalán	<div> La Cena Oficial del Congreso se celebrará en: Restaurante Norai Museu Marítim de Barcelona Avda Drassanes, 1 08001 Barcelona </div>		
16:00	16:30	Obtención de gelatinas de alta calidad a partir de residuos de tenería sin curtir a escala semi-industrial mediante el uso de un tratamiento enzimático M.A. Pérez Limiñana, M.J. Escoto Palacios, F. Arán Aís, M. Roig Orts, C. Orgilés Barceló			
16:30	17:00	Coffee break			
17:00	17:30	Recuperación de taninos procedentes de los residuos de la explotación forestal del pino Felip Combalia, Mireia Conde, Lluís Ollé, Anna Bacardit			
17:30	18:00	EasyWhite Tan (EWT) Claus Reineking, Xavier Casadesus			
	20:30	Cena Oficial del Congreso / Entrega Premio AQEIC			

This is a preview. To view the full content, please purchase this document.

BS EN ISO 17075-2:2017



BSI Standards Publication

Leather — Chemical determination of chromium(VI) content in leather

Part 2: Chromatographic method (ISO
17075-2:2017)

